

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA**

**ADENOCARCINOMA DA AMPOLA DE VATER: PERFIL IMUNO-
HISTOQUÍMICO E FATORES PROGNÓSTICOS**

JOÃO PAULO LEMOS DA SILVEIRA SANTOS

BELO HORIZONTE - MG

2016

João Paulo Lemos da Silveira Santos

**ADENOCARCINOMA DA AMPOLA
DE VATER: PERFIL IMUNO-
HISTOQUÍMICO E FATORES
PROGNÓSTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina.

Área de concentração: Anatomofisiopatogenia Cirúrgica

Linha de Pesquisa: Bases Moleculares das Neoplasias – farmacogenética e farmacogenômica

Orientadora: Profa. Dra. Vivian Resende

Co-orientadora: Profa. Dra. Paula Vieira Teixeira Vidigal

Belo Horizonte – MG

2016

João Paulo Lemos da Silveira Santos

**ADENOCARCINOMA DA AMPOLA DE VATER: PERFIL IMUNO-
HISTOQUÍMICO E FATORES PROGNÓSTICOS**

Dissertação apresentada e defendida perante Comissão Examinadora constituída pelos Professores:

Profa. Dra. Vivian Resende (Orientadora)

Profa. Dra. Paula Vieira Teixeira Vidigal (Co-orientadora)

Prof. Dr. Andre Luis Montagnini (USP)

Prof. Dr. Cristiano Xavier Lima (UFMG)

Suplente - Prof. Dr. Ricardo Neves Godinho (PUC Minas)

Suplente - Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches (UFMG)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR: Prof. Dr. Jaime Arturo Ramírez

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO: Profa. Dra. Denise Maria Trombert de Oliveira

PRÓ-REITOR DE PESQUISA: Profa. Dra. Adelina Martha dos Reis

FACULDADE DE MEDICINA

DIRETOR: Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIRURGIA: Prof. Dr. Renato Santiago Gomez

CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

COORDENADOR: Prof. Dr. Luiz Armando de Marco

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA

COORDENADOR: Prof. Dr. Edson Samesima Tatsuo

SUB-COORDENADOR: Prof. Dr. Túlio Pinho Navarro

Prof. Dr. Agnaldo Soares Lima

Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches

Prof. Dr. Márcio Bittar Nehemy

Prof. Dr. Marco Aurélio Lana

Prof. Dr. Renato Santiago Gomez

Representante discente: Taíse Míriam Cruz Mosso Ramos

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora *Profa. Dra. Vivian Resende*, pela constante crítica, paciência e inspiração; responsável máximo pelo sucesso desta caminhada.

À minha co-orientadora *Profa. Dra. Paula Vieira Teixeira Vidigal*, pelos ensinamentos em patologia e dedicação à realização deste estudo.

À *Profa. Dra. Carla Jorge Machado*, por tornar o caminho sempre pedregoso da estatística médica um pouco menos hostil.

Ao *Prof. Dr. Ricardo Godinho*, amigo das boas horas, conselheiro dos momentos difíceis e grande fomentador do meu espírito acadêmico.

Ao amigo *Stanley de Almeida Araújo*, médico patologista, sempre um companheiro nos estudos, desde os tempos da Faculdade.

Aos amigos *Felippe Mansur, Leonardo do Prado Lima, Rodrigo Vieira Gomes, Thiago Batista e Marco Antônio Elostá*, cirurgiões do aparelho digestivo, pela amizade e união no combate cotidiano da nossa especialidade.

Aos *cirurgiões e aos residentes dos serviços de Cirurgia Geral e de Cirurgia do Aparelho Digestivo do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG*, pela minha formação, pela qualidade técnica de elevado padrão e por tornar meus sonhos realidade.

Aos parceiros do dia-a-dia *Márcio Tadeu Diniz de Sousa e Maria Alves Costa Spinola*, cirurgiões gerais, pelo acolhimento, pelo companheirismo e pelas oportunidades que me proporcionam.

À assistente do laboratório de patologia *Fernanda Cassali* por, literalmente, pegar nas minhas mãos e me ensinar como fazer.

Às Instituições *FAPEMIG, CNPq e CAPES*, pelo apoio à realização desse estudo e pela contribuição na formação acadêmica dos pesquisadores desse grupo.

Aos meus pais,

*João Cândido e Stael, pelo incentivo constante e
pelo apoio em todos os momentos da minha vida.*

À minha esposa,

*Raquel, pelo seu companheirismo
incondicional.*

RESUMO

Em 1994, Kimura *et al.* descreveram dois tipos histológicos dos adenocarcinomas da ampola de Vater: o tipo intestinal e o tipo pancreatobiliar. A classificação histopatológica dos tumores ampulares representa um desafio para os patologistas e relaciona-se com o prognóstico e com o tratamento dos pacientes. Este estudo objetivou definir o fenótipo dos adenocarcinomas da ampola de Vater por meio da expressão imuno-histoquímica de MUC1, MUC2, MUC5AC, CDX2, CK7, CK20 e EpCAM, e identificar fatores prognósticos desta doença. Foram estudados 30 pacientes com carcinomas ampulares submetidos a duodenopancreatectomia (R0) em uma instituição. Obteve-se a classificação dos tumores em tipos intestinal e pancreatobiliar. Avaliou-se a relação dessa classificação com as variáveis clinicopatológicas e com a sobrevida. Os dados foram analisados utilizando-se métodos univariados e multivariados. O método multivariado de *Cluster* foi utilizado para determinar os marcadores imuno-histoquímicos que melhor discriminaram os tipos histológicos. A mediana das idades dos pacientes foi 62 anos. Nove (30%) tumores foram do tipo intestinal e 21 (70%) do tipo pancreatobiliar. Os marcadores CDX2 (intestinal), e CK7 (pancreatobiliar) foram os que melhor discriminaram os tumores. Na análise univariada, houve associação significativa entre o tipo pancreatobiliar e acometimento linfonodal ($p=0,029$), invasão angiolímfática ($p=0,002$) e perineural ($p=0,049$). A única variável independente associada ao tipo histológico, pancreatobiliar, foi a invasão angiolímfática ($p=0,005$, OR=17 [IC95% 2,33 a 123,83]). A sobrevida global aos 12, 24, 36 e 60 meses foi de 87,8%, 75,2%, 69,9% e 65,3%. Na análise univariada da sobrevida, as variáveis com impacto foram idade ($p=0,012$), acometimento linfonodal ($p=0,002$), grau de invasão tumoral ($p=0,013$), estadiamento ($p<0,001$), invasão angiolímfática ($p=0,010$) e perineural ($p=0,004$). O modelo final multivariado mostrou associação significativa entre menor sobrevida e a presença de acometimento linfonodal (HR = 9,03, $p=0,009$). Em conclusão, os marcadores imuno-histoquímicos que melhor discriminaram os tipos histológicos foram CDX2 (intestinal) e CK7 (pancreatobiliar). O acometimento linfonodal teve grande impacto na sobrevida e foi mais frequente no tipo pancreatobiliar.

[**Palavras-chave:** ampola de Vater, adenocarcinoma periampular, imuno-histoquímica, mucinas, citoqueratinas, duodenopancreatectomia, prognóstico]

SUMMARY

The two types of ampullary cancer, intestinal and pancreatobiliary were first described by Kimura *et al.* in 1994. The histopathological classification of ampullary cancer has been described as a prognostic factor and may be important in adjuvant chemotherapy decision. The aim of this study was to define the phenotype of the ampulla of Vater adenocarcinoma by immunohistochemical expression of MUC1, MUC2, MUC5AC, CDX2, CK7, CK20 and EPCAM, and determine prognostic factors. We studied 30 patients with ampullary cancer undergoing to surgical resection (R0) in a single institution. Tumors were classified in intestinal type and pancreatobiliary type and their relationship with clinicopathological variables and survival were analyzed. Data were analyzed using univariate and multivariate methods. The Cluster multivariate method was used to determine the immunohistochemical markers that best discriminated intestinal and pancreatobiliary types. The immunohistochemical markers that best discriminated histological types were CDX2 (intestinal) and CK7 (pancreatobiliary). The mean age of patients was 62 years (range, 54-72 years). Nine (30%) tumors were intestinal and 21 (70%) pancreatobiliary. The best markers to discriminate these types were CDX2 and CK7. The variables with significant association with pancreatobiliary type in univariate analysis were lymph nodes involvement ($p=0.029$), angiolymphatic invasion ($p=0.002$) and perineural invasion ($p=0.04$). In multivariate model the independent variable associated to the histological type was angiolymphatic invasion ($p=0.005$, OR = 17). Overall survival at 12, 24, 36 and 60 months was 87.8%, 75.2%, 69.9% and 65.3%. In univariate analysis, the variables with impact on survival were age ($p=0.012$), lymph node involvement ($p=0.002$), tumor invasion ($p=0.013$), stage ($p<0,001$), angiolymphatic ($p=0.010$) and perineural invasion ($p=0.004$). In multivariate model a significant association between poor survival and lymph node involvement was demonstrated (HR=9.03, $p=0.009$). In conclusion, the immunohistochemical markers that best discriminated histological types were CDX2 (intestinal) and CK7 (pancreatobiliary). Lymph node involvement had a major impact on survival and was more frequent in pancreatobiliary type.

[**Key words:** Ampulla of Vater, ampullary adenocarcinoma, immunohistochemistry, mucins, keratins, pancreaticoduodenectomy, prognosis.]

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ampola de Vater e os diferentes tipos de mucosa que podem dar origem às neoplasias. A; mucosa tipo intestinal, B; epitélio simples mucinoso biliar; C; epitélio simples mucinoso pancreático.20

Figura 2: Operação de escolha para o tratamento dos pacientes com TAV. A, gastroduodenopancreatectomia cefálica. B, duodenopancreatectomia com preservação do piloro.....27

Figura 3: Estudo histopatológico dos espécimes cirúrgicos dos TAV do tipo pancreatobiliar (a,b,c) e intestinal (d,e,f). (a,d) aspecto macroscópico a fresco, (b,c) fixado em solução de formol a 10%, (c,f) aspecto microscópico, em HE (200x).....28

Figura 4: Cortes histológicos de adenocarcinoma da ampola de Vater. a, c: tipo pancreatobiliar - glândulas simples ou ramificadas, células cuboides ou pouco alongadas, núcleos centralizados no citoplasma; b, d: tipo intestinal – glândulas alongadas, aspecto cribiforme, células colunares e núcleo localizado na base. HE (a, b: 200x, c, d: 400x).29

Figura 5: Expressão de MUC1 e MUC2 nos adenocarcinomas da ampola de Vater. (a) e (c), tumor tipo pancreatobiliar MUC1+ (a) e MUC2- (c). (b) e (d), tumor tipo intestinal MUC1- (b) e MUC2+ (d). A marcação da MUC1 é citoplasmática, difusa e granular como pode ser observado em (a). A marcação da MUC2 é também citoplasmática e granular, porém densa e acentuada nas células caliciformes que podem ser vistas em coloração marrom-escuro em (d).
.....41

Figura 6: Expressão de MUC5AC e CDX2 nos adenocarcinomas da ampola de Vater. (a) e (c), tumor tipo pancreatobiliar MUC5AC+ (a) e CDX2- (c). (b) e (d), tumor tipo

intestinal MUC5AC- (b) e CDX2+ (d). A marcação da MUC5AC é citoplasmática, granular e apical. Já a marcação do CDX2 é granular, difusa, mais densa no núcleo celular.....42

Figura 7: Expressão de CK7 e CK20 nos adenocarcinomas da ampola de Vater. (a) e (c), tumor tipo pancreatobiliar CK7+ (a) e CK20- (c). (b) e (d), tumor tipo intestinal CK7- (b) e CK20+ (d). Tanto as marcações da CK7 quanto da CK20 são granulares, difusas e citoplasmáticas. (*) observar o controle interno CK7+ no epitélio das glândulas biliares (b). 43

Figura 8: Expressão de EpCAM+ nos adenocarcinomas da ampola de Vater. (a), tumor tipo pancreatobiliar; (b), tumor tipo intestinal. A marcação da EpCAM é predominantemente superficial membranar.44

Figura 9: Frequência, em porcentagem, da expressão dos marcadores imuno-histoquímicos nos dois grupos (clusters) de pacientes.54

Figura 10: Distribuição da frequência, em número de casos, da expressão dos marcadores imuno-histoquímicos nos dois grupos (clusters) de pacientes.55

Figura 11: Importância de cada marcador imuno-histoquímico como preditor na conformação dos grupos (clusters).57

Figura 12: Curva de Kaplan-Meier da sobrevida global dos 26 pacientes com adenocarcinoma da ampola de Vater..... 62

Figura 13: Curva de Kaplan-Meier da sobrevida dos 26 pacientes com adenocarcinoma da ampola de Vater segundo a idade. Teste de igualdade de curvas: Logrank (p=0,012), Wilcoxon (p=0,007), Tarone Ware (p=0,007).....63

Figura 14: Curva de Kaplan-Meier da sobrevida dos 26 pacientes com adenocarcinoma da ampola de Vater segundo a classificação histológica. Teste de igualdade de curvas: Logrank (p=0,180), Wilcoxon (p=0,096), Tarone Ware (p=0,112)..... 64

Figura 15: Curva de Kaplan-Meier da sobrevida dos 26 pacientes com adenocarcinoma da ampola de Vater segundo o grau de invasão tumoral (T) da classificação

TNM do estadiamento AJCC. Teste de igualdade de curvas: Logrank (p=0,013), Wilcoxon (p=0,007), Tarone Ware (p=0,009).	65
Figura 16: Curva de Kaplan-Meier da sobrevida dos 26 pacientes com adenocarcinoma da ampola de Vater segundo o acometimento linfonodal (N) da classificação TNM do estadiamento AJCC. Teste de igualdade de curvas: Logrank (p=0,002), Wilcoxon (p=0,006), Tarone Ware (p=0,003).	66
Figura 17: Curva de Kaplan-Meier da sobrevida dos 26 pacientes com adenocarcinoma da ampola de Vater segundo o estadiamento TNM AJCC. Teste de igualdade de curvas: Logrank (p=0,0005), Wilcoxon (p=0,0008), Tarone Ware (p=0,0006).....	67
Figura 18: Curva de Kaplan-Meier da sobrevida dos 26 pacientes com adenocarcinoma da ampola de Vater segundo a invasão angiolinfática. Teste de igualdade de curvas: Logrank (p=0,0104), Wilcoxon (p=0,0136), Tarone Ware (p=0,0104).....	68
Figura 19: Curva de Kaplan-Meier da sobrevida dos pacientes com adenocarcinoma da ampola de Vater segundo a invasão perineural. Teste de igualdade de curvas: Logrank (p=0,0046), Wilcoxon (p=0,0032), Tarone Ware (p=0,0031).....	69
Figura 20: Curva de Kaplan-Meier da sobrevida dos 26 pacientes com adenocarcinoma da ampola de Vater segundo a expressão da citoqueratina CK7. Teste de igualdade de curvas: Logrank (p=0,134), Wilcoxon (p=0,068), Tarone Ware (p=0,080).	70
Figura 21: Curva de Kaplan-Meier da sobrevida dos 26 pacientes com adenocarcinoma da ampola de Vater segundo a expressão do fator de transcrição CDX2. Teste de igualdade de curvas: Logrank (p=0,134), Wilcoxon (p=0,068), Tarone Ware (p=0,080). .	71
Figura 22: Taxas de incidência dos tipos histológicos intestinal e pancreatobiliar reportadas na literatura.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Diferenças clinicopatológicas entre o tipo intestinal e o tipo pancreatobiliar dos adenocarcinomas da Ampola de Vater.....	21
Tabela 2: Especificações dos anticorpos primários utilizados nas reações imuno-histoquímicas.....	31
Tabela 3: Variáveis demográficas e clínicas dos 30 pacientes com adenocarcinoma da ampola de Vater.....	36
Tabela 4: Características clínicas, cirúrgicas, laboratoriais e patológicas dos 30 pacientes com adenocarcinoma da ampola de Vater.....	38
Tabela 5: Características imuno-histoquímicas dos 30 pacientes com adenocarcinoma da Ampola de Vater.....	40
Tabela 6: Associação entre os tipos intestinal e pancreatobiliar e as variáveis demográficas e clínicas dos 30 pacientes com adenocarcinoma da ampola de Vater.....	47
Tabela 7: Associação entre os tipos intestinal e pancreatobiliar e as variáveis clínicas, cirúrgicas e patológicas dos 30 pacientes com adenocarcinoma da ampola de Vater.....	50
Tabela 8: Associação entre os tipos histológicos e os imunomarcadores dos 30 adenocarcinomas da ampola de Vater.....	52
Tabela 9: Classificação do tipo histológico dos adenocarcinomas da ampola de Vater pela imuno-histoquímica e pelo método estatístico (agrupamentos semelhantes).....	58
Tabela 10: Densidade de incidência de óbito, sobrevida média e mediana, e percentual de sobreviventes aos 12, 24, 36 e 60 meses, de acordo com as variáveis de impacto na sobrevida dos pacientes com adenocarcinoma da ampola de Vater.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TAV	Tumor da Ampola de Vater
TI	Tipo histológico intestinal
TPB	Tipo histológico pancreatobiliar
R0	Ressecção tumoral completa, sem margens comprometidas
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
HC	Hospital das Clínicas
SAME	Serviço de Arquivo Médico e Estatística
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CAAE	Certificado de Avaliação e Autorização Ética
APM	Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal
H0	Hipótese nula
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
HE	Hematoxilina-eosina (coloração)
AJCC	American Joint Committee on Cancer
UICC	International Union for Cancer Control

TNM	Estadiamento do grau de invasão tumoral, do acometimento linfonodal e da presença de metástases a distância
IHQ	Imuno-histoquímica
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
DAB	Diaminobenzidina
TRIS	Solução tampão para recuperação antigênica
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
MUC	Mucina, glicoproteína
CK	Citoqueratina basal
EpCAM	Molécula de adesão celular epitelial (<i>Epithelial Cell Adhesion Molecular</i>)
CDX2	Fator de transcrição nuclear
OMS	Organização Mundial de Saúde
WHO	<i>World Health Organization</i>
CEA	Antígeno cárcino-embriogênico
CA 19.9	Antígeno do câncer 19.9
GDP	Gastroduodenopancreatectomia cefálica
DPPP	Duodenopancreatectomia cefálica com preservação do piloro
HD	Artéria hepática direita
IC	Intervalo de confiança
IAPN	<i>Intra-ampullary Papillary-tubular Neoplasm</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
µm	Micrômetro
pH	Potencial de hidrogênio
ml	Mililitro
%	Porcentagem
+	Positivo (expressão)
-	Negativo (não-expressão)
cm	Centímetro
k	Índice de concordância Kappa
HR	Razão de risco (<i>Hazard ratio</i>)
OR	<i>Odds ratio</i>
IIQ	Intervalo interquartilico
DP	Desvio padrão
Pr	Proporção

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	19
2.	OBJETIVO	24
3.	MÉTODO	25
	3.1 Desenho do estudo	25
	3.2 Aspectos éticos	25
	3.3 Financiamento.....	25
	3.4 Casuística.....	25
	3.4.1 Critérios de inclusão	26
	3.4.2 Critérios de exclusão	26
	3.5 Técnica operatória	26
	3.6 Estudo histológico	27
	3.7 Estudo imuno-histoquímico.....	30
	3.8 Análise estatística	32
4.	RESULTADOS	35
	4.1 Análise descritiva das características clínicas	35
	4.2 Análise imuno-histoquímica.....	39
	4.3 Associação entre os tipos histológicos e as características demográficas e clínicopatológicas	45
	4.3.1 Análise univariada	45
	4.3.2 Análise multivariada.....	51

4.4 Associação entre os tipos histológicos e a expressão dos marcadores imuno-histoquímicos	51
4.4.1 Análise univariada	51
4.4.2 Análise pelo método de agrupamentos semelhantes (two step cluster) dos marcadores imuno-histoquímicos	53
4.5 Análise da concordância entre os métodos utilizados na classificação dos tumores: imuno-histoquímica e agrupamentos semelhantes (cluster)	57
4.6 Análise da densidade de incidência dos óbitos e da sobrevida.....	58
5. DISCUSSÃO	72
5.1 Dados demográficos e clínicos	72
5.2 Tratamento cirúrgico	73
5.3 Quimioterapia adjuvante.....	74
5.4 Tipo histológico	75
5.5 Acurácia dos marcadores imuno-histoquímicos	76
5.6 Índice de concordância: histologia versus imuno-histoquímica.....	78
5.7 Sobrevida e fatores prognósticos	80
5.8 Limitações e perspectivas	81
6. CONCLUSÃO	83
7. REFERÊNCIAS.....	84
8. ANEXOS	91
Anexo A – Classificação TNM (AJCC, 7ª edição, 2010).....	91

Anexo B - Ofício de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG.....	93
Anexo C – Folha de aprovação.....	94
Anexo D – Ata da defesa da dissertação	95

1. INTRODUÇÃO

Os tumores da ampola de Vater (TAV) são raros e acometem com maior frequência pacientes do sexo masculino com idade superior a 50 anos. Entre 1973 e 2005, a sua incidência, por ano, nos Estados Unidos foi estimada em cinco a sete casos por milhão de habitantes. Correspondem a 0,5% dos tumores do trato gastrointestinal¹ e de 6 a 20% dos tumores periampulares², com origem do ducto biliar distal, duodeno, ampola de Vater e cabeça do pâncreas.

A ampola hepatopancreática ou ampola de Vater é uma região anatomicamente complexa constituída por um canal comum, onde três estruturas se confluem, sendo elas o ducto pancreático principal, o colédoco distal e o duodeno, cada uma com suas características histológicas e fisiológicas próprias. Os ductos percorrem por, aproximadamente, dois centímetros no interior da parede póstero-medial da segunda porção duodenal e se esvaziam na ampola hepatopancreática ou ampola de Vater, que se desemboca no ápice da papila duodenal maior.³

Existem dois tipos de epitélios que se confluem na região da ampola de Vater. O epitélio simples mucinoso do tipo intestinal que reveste a papila duodenal maior e o epitélio simples mucinoso do tipo pancreatobiliar que reveste a ampola de Vater, o ducto pancreático e o colédoco distal. Dessa forma, os tumores ampulares podem originar-se de dois tipos de epitélio morfológicamente heterogêneos, o que lhes atribui comportamento biológico e clínico distintos (**Figura 1**).

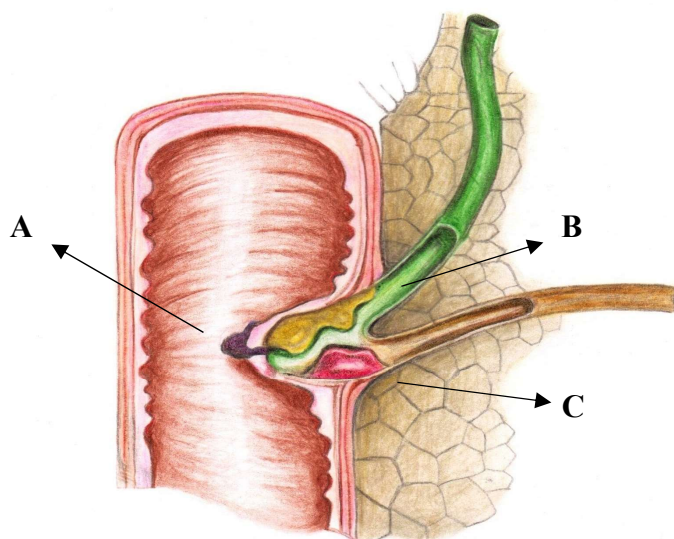


Figura 1: Ampola de Vater e os diferentes tipos de mucosa que podem dar origem às neoplasias. A; mucosa tipo intestinal, B; epitélio simples mucinoso biliar; C; epitélio simples mucinoso pancreático.

Fonte: Extraída e adaptada de HADDAD, L. B. P., 2009 (Tese de Doutorado).

Em 1994, pela primeira vez, Kimura *et al.* descreveram os dois tipos histológicos dos adenocarcinomas da ampola de Vater: o tipo intestinal (TI) e o tipo pancreatobiliar (TPB). A prevalência do tipo pancreatobiliar foi de 72%, maior do que o do tipo intestinal.⁴ Albores-Saavedra *et al.*, em 2000, definiram as características morfológicas destes tumores, além de descreverem outros tipos menos comuns, como carcinomas de células em anel de sinete, indiferenciados, mucinosos e carcinomas sólidos.⁵ Westgaard *et al.* e Schirmacher *et al.*, em 2008, dentre outros estudos, viram que a diferença de sobrevida do carcinoma periampular é mais dependente de seu tipo histológico do que de seu local anatômico de origem – duodenal, ampular, biliar distal ou pancreático.^{6; 7; 8; 9}

Os dois tipos histológicos dos TAV parecem ser distintos quanto à patogênese. Estas diferenças entre eles relacionam-se ao tipo histológico, às lesões precursoras, aos marcadores celulares, à expressão de oncogenes, ao modo de disseminação tumoral e à relação com a sua matriz extracelular.^{7; 9; 10}

Os tumores do tipo intestinal apresentam-se, geralmente, em estádios menos avançados, possuem melhor prognóstico e podem originar-se de uma lesão adenomatosa precursora, seguindo a sequência adenoma-displasia-adenocarcinoma. Já os tumores do

tipo pancreatobiliar apresentam-se, geralmente, em estádios mais avançados, possuem pior prognóstico e parecem se associar, mais frequentemente, com lesões neoplásicas intraepiteliais ductais precursoras, podendo também ter origem de lesões polipoides com fenótipo pancreatobiliar.^{2; 11; 12; 13; 14}

A **Tabela 1** mostra as principais diferenças clinicopatológicas dos TAV dos tipos intestinal e pancreatobiliar.

Tabela 1: Diferenças clinicopatológicas entre o tipo intestinal e o tipo pancreatobiliar dos adenocarcinomas da Ampola de Vater.

	Tipo intestinal	Tipo pancreatobiliar
Características histológicas	Glândulas alongadas, epitélio tubular, complexo cribiforme e ninhos celulares sólidos	Glândulas simples ou ramificadas, pequenos ninhos celulares sólidos circundados por estroma desmoplásico
Acometimento linfonodal	Baixa incidência	Alta incidência
Estadiamento	Mais precoce	Mais avançado
Invasão perineural	Baixa incidência	Alta incidência
Sobrevida após ressecção	Longa	Curta
Recorrência	Baixa	Alta

Fonte: Extraída e modificada de Perysinakis *et al.*, 2014.

A icterícia é um sinal clínico precoce nos TAV, permitindo o diagnóstico da doença ainda na fase inicial de sua evolução. Esta característica clínica aumenta a possibilidade de ressecções cirúrgicas potencialmente curativas.^{15; 16} O fato desses tumores crescerem, relativamente, distantes dos vasos mesentéricos e do tronco celíaco constitui outro aspecto que contribui para a realização de maior número de ressecções com margens livres da doença, quando comparados com os tumores pancreáticos e biliares distais.^{8; 17; 18}

O único tratamento potencialmente curativo do adenocarcinoma invasivo da ampola de Vater consiste em sua ressecção completa (R0). A operação de escolha é a duodenopancreatectomia cefálica, com preservação pilórica (DPPP) ou sem preservação pilórica (GDP), associada sempre à linfadenectomia regional.^{19; 20; 21} A ressecção radical é a melhor opção, mesmo em tumores invasivos iniciais, uma vez que metástases linfonodais podem estar presentes em aproximadamente 30% dos casos com tumores confinados à ampola.^{19; 22} A ressecção endoscópica, por meio de ampulectomia, tem sido realizada em casos selecionados de tumores não invasivos.^{19; 20; 21}

O papel da quimioterapia e da radioterapia, nos pacientes com TAV ainda não está definido.^{23; 24} O tratamento quimioterápico adjuvante tem sido indicado em casos localmente avançados e com acometimento metastático linfonodal.²⁴

Os TAV possuem prognóstico melhor do que os adenocarcinomas de pâncreas e os colangiocarcinomas distais.^{8; 16; 24; 25; 26} As taxas globais de sobrevida em 5 anos dos adenocarcinomas da ampola e do pâncreas são de 40-45% e de apenas 10-20%, respectivamente.¹⁷ O tratamento dos TAV alcança taxas de cura acima de 50%, enquanto o tratamento dos adenocarcinomas do pâncreas alcança esta taxa em apenas 10% dos casos.⁷

Devido ao seu prognóstico, reconhecidamente, diferente em relação ao demais tumores periampulares, uma classificação TNM (AJCC, 7ª edição, 2010) foi descrita para os TAV^{27; 28} (**Anexo A**). Parâmetros clínicos, como idade, sexo e estado geral, e parâmetros anatomopatológicos como tipo histológico, grau de diferenciação, invasão angiolinfática, invasão neural, margens cirúrgicas e classificação TNM, além de marcadores imuno-histoquímicos, foram identificados como fatores prognósticos significativos.^{16; 18; 22; 25; 29; 30; 31; 32}

A classificação histológica correta dos TAV, em seus tipos intestinal e pancreatobiliar, representa um desafio para os patologistas.^{6; 33} A imuno-histoquímica aumenta a capacidade de se fazer esta classificação, visto que, por meio deste método, anticorpos específicos se ligam aos antígenos da mucosa de origem das células tumorais.^{34; 35} Os marcadores imuno-histoquímicos mais utilizados como fatores prognósticos e, também, na discriminação dos tipos histológicos intestinal e pancreatobiliar, têm sido as mucinas - MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7 e MUC8; as citoqueratinas basais - CK7, CK17 e CK20; e o fator nuclear de transcrição CDX2.^{34; 35; 36; 37; 38; 39; 40; 41; 42}

Há poucos estudos sobre os tipos histomoleculares dos TAV na população brasileira. A classificação adequada destes tumores repercute no tratamento e no prognóstico dos pacientes.

Nesse estudo, propõe-se realizar um painel imuno-histoquímico com os marcadores que se mostraram mais efetivos na análise da literatura: MUC1, MUC2, MUC5AC, CDX2, CK7 e CK20. Incluiu-se ainda, de forma inédita, o marcador EpCAM (*Epithelial Cell Adhesion Molecules*), com o objetivo de avaliar sua importância no contexto dos TAV, tendo em vista, o crescente número de publicações que surgiu nos últimos anos em relação à expressão deste marcador em tumores humanos, como os tumores de intestino e pâncreas e, ainda, o desenvolvimento de um fármaco alvo-específico para o tratamento das neoplasias que expressam este antígeno.^{43; 44; 45; 46; 47}

2. OBJETIVO

Objetivo geral:

Definir o fenótipo dos adenocarcinomas da ampola de Vater por meio da expressão imuno-histoquímica de MUC1, MUC2, MUC5AC, CDX2, CK7, CK20 e EpCAM.

Objetivos específicos:

- Identificar entre os marcadores imuno-histoquímicos aqueles que melhor distinguem os tipos histológicos;
- Avaliar quais características clinicopatológicas estão associadas aos tipos histológicos;
- Avaliar quais características clinicopatológicas tem impacto negativo na sobrevida dos pacientes.

3. MÉTODO

3.1 DESENHO DO ESTUDO

Tratou-se de um estudo longitudinal realizado em uma única instituição de atenção terciária.

Foram estudados os pacientes assistidos no período de 2003 a 2014. Os dados coletados entre 2003 e 2011, referentes a 21 pacientes, foram analisados retrospectivamente, por meio da consulta a prontuários médicos, enquanto os dados coletados entre 2012 e 2014, referentes a 9 pacientes, foram analisados prospectivamente, a partir do preenchimento de protocolos específicos de pesquisa e acompanhamento clínico ambulatorial.

3.2 ASPECTOS ÉTICOS

Essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com o número de protocolo CAAE – 23377113.1.0000.5149 (**Anexo B**).

3.3 FINANCIAMENTO

Esse trabalho teve o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

3.4 CASUÍSTICA

Foram estudados 30 pacientes acometidos de adenocarcinoma da ampola de Vater, atendidos no ambulatório Jenny Faria, pelo Grupo de Cirurgia do Fígado, Pâncreas, Vias Biliares e Baço do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das

Clínicas (HC) da UFMG, todos submetidos a ressecção completa (R0) dos seus tumores no período de 2003 a 2014.

3.4.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos neste estudo:

- Pacientes com adenocarcinoma da ampola de Vater;
- Pacientes submetidos a ressecção R0;
- Pacientes atendidos no período de 2003 a 2014, acompanhados no Serviço de Cirurgia do Fígado, Vias Biliares, Pâncreas e Baço do HC-UFMG.

3.4.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos deste estudo:

- Pacientes com outros tumores periampulares como os da via biliar distal, do pâncreas e do duodeno;
- Pacientes com tumores não classificados como adenocarcinomas;
- Pacientes submetidos apenas a biópsia ou a operações paliativas como operações não-R0, colocação de próteses ou confecções de derivações biliodigestivas;
- Pacientes com metástases a distância (estádio IV).

Foram excluídos, ainda, três pacientes dos quais os blocos de parafina de seus tumores não foram localizados no arquivo do Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal (APM) da Faculdade de Medicina da UFMG.

3.5 TÉCNICA OPERATÓRIA

Todos os pacientes foram operados no HC-UFMG pela equipe de Cirurgia do Fígado, Vias Biliares, Pâncreas e Baço do Instituto Alfa de Gastroenterologia,

seguindo a padronização técnica do grupo. A operação foi a duodenopancreatectomia cefálica radical, com ou sem preservação pilórica, associada a linfadenectomia regional, com ressecção completa do tumor (R0). A reconstrução do trânsito foi em alça única e a pancreatojejunoanastomose foi término-lateral e ducto-mucosa em todos estes casos (**Figura 2**). A ampulectomia por via laparotômica foi realizada em apenas um caso.

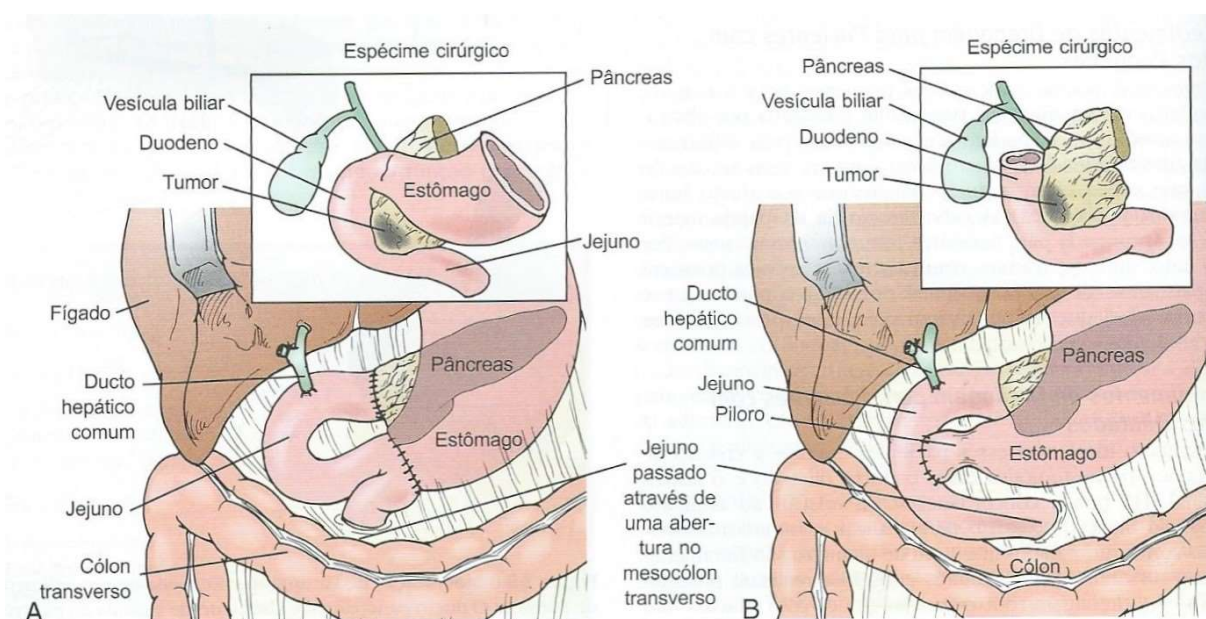


Figura 2: Operação de escolha para o tratamento dos pacientes com TAV. **A**, gastroduodenopancreatectomia cefálica. **B**, duodenopancreatectomia com preservação do piloro.

Fonte: Extraída e adaptada de SABISTON, D. C., 2008.⁴⁸

3.6 ESTUDO HISTOLÓGICO

Todos os pacientes estudados tiveram seus blocos de parafina recuperados dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica (APM) da Faculdade de Medicina da UFMG.

Os espécimes cirúrgicos foram processados e analisados no APM, seguindo o protocolo deste serviço. Os espécimes foram, inicialmente, fixados em formol a 10% por 24 horas. A análise teve início com o exame macroscópico, com a retirada de

amostras do tumor e dos demais sítios correlacionados – colédoco distal, duodeno, pâncreas, papila e linfonodos. Essas amostras coletadas foram processadas automaticamente e incluídas em parafina. Os blocos de parafina foram cortados por microtomia, obtendo-se cortes com espessura de 4 μ m que foram montados em lâminas de vidro e corados pelo método da hematoxilina-eosina (HE). As **Figuras 3 e 4** ilustram esses procedimentos.

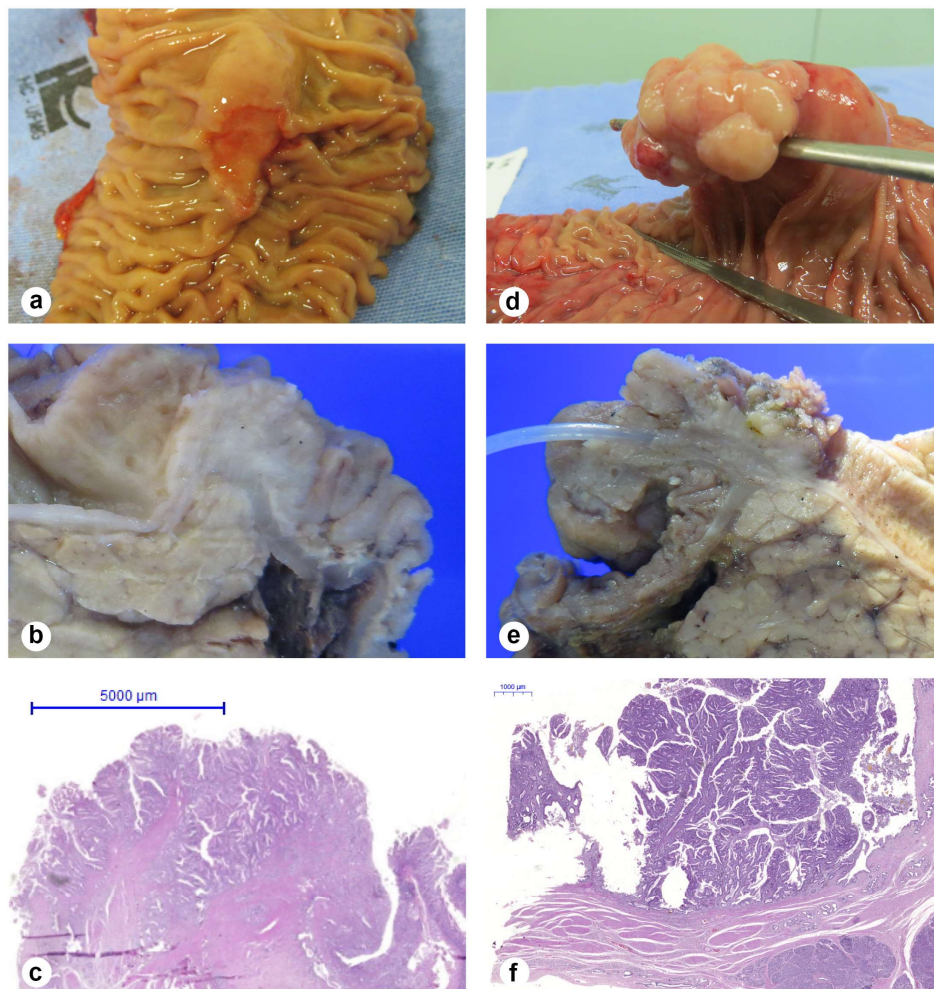


Figura 3: Estudo histopatológico dos espécimes cirúrgicos dos TAV do tipo pancreatobiliar (**a,b,c**) e intestinal (**d,e,f**). (**a,d**) aspecto macroscópico a fresco, (**b,c**) fixado em solução de formol a 10%, (**c,f**) aspecto microscópico, em HE (200x).

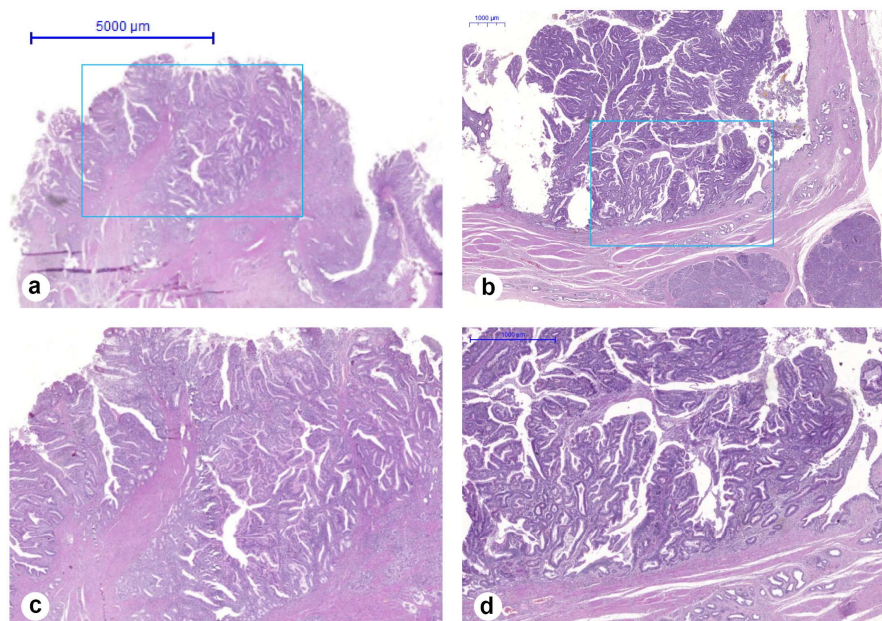


Figura 4: Cortes histológicos de adenocarcinoma da ampola de Vater. **a, c:** tipo pancreatobiliar - glândulas simples ou ramificadas, células cuboides ou pouco alongadas, núcleos centralizados no citoplasma; **b, d:** tipo intestinal – glândulas alongadas, aspecto cribiforme, células colunares e núcleo localizado na base. HE (**a, b:** 200x, **c, d:** 400x).

A análise histológica de todas as lâminas foi realizada por um patologista experiente, que desconhecia a evolução clínica dos pacientes, o qual classificou os tumores em tipo intestinal e tipo pancreatobiliar.

Dos blocos de parafina recuperados retrospectivamente dos pacientes tratados no período de 2003 a 2011 foram confeccionadas novas lâminas, coradas por HE e revisadas pelo patologista.

Dos laudos anatomopatológicos foram obtidos o tamanho dos tumores, as margens cirúrgicas de ressecção, o acometimento linfonodal e o estadiamento pTNM.

Todas as lâminas foram revisadas para obter-se dados referentes à invasão angiolinfática e perineural.

Os tumores foram classificados de acordo com a nomenclatura da Organização Mundial de Saúde (OMS), de 2010, e levando-se em conta os trabalhos de referência para este fim da literatura.^{4;5}

O estadiamento da doença foi definido de acordo com o estadiamento TNM da AJCC/UICC, em sua 7ª edição, de 2010^{27; 28} (**Anexo A**).

3.7 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

As lâminas coradas em HE serviram como parâmetro para selecionar-se o bloco de parafina mais adequado para a imuno-histoquímica, sendo escolhido aquele que continha uma área representativa do tumor. A partir do bloco de parafina escolhido, novos cortes de 4µm de espessura foram obtidos e colocados em lâminas previamente carregadas, utilizando-se o método de silanização.

O processo de desparafinização foi realizado em duas etapas, uma quente e outra em temperatura ambiente. Na primeira etapa, as lâminas foram mantidas a 60°C em uma estufa por 12 horas. Na segunda etapa, em temperatura ambiente, elas receberam dois banhos de xilol de 10 minutos cada. Em seguida, elas foram reidratadas com três banhos em solução de álcool etílico de concentrações decrescentes: absoluto, 70% e 50%. Por fim, elas foram lavadas por 3 minutos em água corrente.

No processo de reativação ou recuperação antigênica, as lâminas foram levadas a um aparelho do tipo *Steamer* (Cuisinart® Turbo Connection Steamer), mergulhadas em solução de citrato pH 6,0, sob uma temperatura de 98°C, durante 20 minutos. Após resfriadas por 20 minutos em temperatura ambiente, elas foram lavadas com uma solução tampão TRIS/EDTA pH 9,0.

Para o bloqueio da peroxidase endógena, as lâminas foram imersas em solução de peridol (1mL de peróxido de hidrogênio a 30% para cada 9mL de água destilada) por 10 minutos. A seguir, elas foram lavadas com tampão TRIS. Seguiu-se com o bloqueio de proteínas. Logo após, foram adicionados os anticorpos primários às lâminas que foram incubadas em câmara úmida, sob temperatura ambiente, por 24 horas.

Os anticorpos utilizados e suas respectivas diluições encontram-se na **Tabela 2**.

Tabela 2: Especificações dos anticorpos primários utilizados nas reações imunohistoquímicas.

Anticorpo monoclonal	Clone	Marca	Diluição
Anti MUC 1 (Coelho)	EP1024Y	Abcam®	1:200
Anti MUC 2 (Coelho)	EPR6145	Abcam®	1:200
Anti MUC 5AC (Rato)	45M1	Abcam®	1:100
Anti CDX2 (Coelho)	EPR2764Y	Abcam®	1:200
Anti EpCAM (Camundongo)	B302 (323/A3)	Abcam®	1:100
Anti CK7 (Coelho)	EPR11619Y	Abcam®	1:200
Anti CK20 (Coelho)	EPR1622Y	Abcam®	1:200

Após 24 horas, as lâminas foram lavadas mais três vezes com a solução TRIS e adicionou-se a solução de complemento por 20 minutos. Essa solução contém um reagente facilitador do conjugado enzimático polímero peroxidase. Após mais três banhos com o TRIS, adicionou-se a solução do conjugado enzimático por 30 minutos em câmara úmida, sob temperatura ambiente.

Lavou-se outras três vezes as lâminas com solução TRIS e adicionou-se o cromógeno (diaminobenzidina (DAB) a 60% em solução salina tamponada com fosfato (PBS) + 1,5mL de peróxido de hidrogênio a 20 volumes), deixando-o reagir por 10 minutos.

Após outra lavagem das lâminas com a solução TRIS, realizou-se a contracoloração com hematoxilina. As lâminas foram lavadas novamente com água corrente por 5 minutos, embebidas em álcool etílico com concentrações

progressivamente maiores – 50%, 70% e absoluto – e em xilol. Em seguida, os cortes foram recobertos por lamínula contendo meio transparente de montagem *Entellan*.

A análise das lâminas foi realizada pelo mesmo patologista presente em todas as fases do estudo anatomopatológico, o qual desconhecia a evolução clínica dos pacientes. Para a análise das mucinas (MUC1, MUC2 e MUC5AC) e das citoqueratinas (CK7 e CK20) a expressão considerada foi citoplasmática, para o fator de transcrição (CDX2) foi nuclear e para a molécula EpCAM foi superficial membranar. A interpretação foi semiquantitativa, considerando-se positivos os tumores que revelaram positividade para os marcadores imuno-histoquímicos em área do tumor maior ou igual a 10%.^{6; 32; 36; 38}

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística caracterizou 30 adenocarcinomas da ampola de Vater e os classificou em grupos distintos, de acordo com o seu imunofenótipo. Além disso, estudou a sobrevida dos pacientes portadores desses tumores, de acordo com as múltiplas variáveis avaliadas. Esta análise estatística foi realizada com auxílio do programa Stata[®] para MAC (Macintosh[®]) versão 12.

O estudo estatístico teve início com a análise descritiva dos dados. A análise das variáveis contínuas foi realizada por meio de medidas de tendência central, dispersão e amplitude - média e desvio padrão; mediana (percentil 50) e intervalo interquartil (percentis 25 e 75); valores mínimo e máximo. Já a análise das variáveis categóricas foi realizada por meio de distribuição das frequências absolutas e relativas em cada categoria.

Ainda na descrição dos dados, com a finalidade de testar a homogeneidade de cada variável estudada, foi efetuado o teste de Qui-quadrado - para aquelas com cinco ou mais categorias - ou o teste exato de Fisher – para aquelas com até quatro categorias, considerando sempre a existência de igualdade nas categorias das variáveis como hipótese nula (H_0). Assim, a hipótese nula considerada para variáveis com duas categorias foi que haveria proporção igual a 50% em cada categoria ($H_0: pr=0,5$); para três categorias, 33,3% ($H_0: pr=0,33$); para quatro categorias, 25% ($H_0: pr=0,25$).

A análise estatística também verificou se o resultado da expressão dos imunomarcadores utilizados poderia separar os adenocarcinomas em grupos distintos,

que apresentassem características internas semelhantes. O método utilizado para identificar a capacidade dos imunomarcadores em discriminar os tipos de tumores foi o de agrupamento denominado *two step cluster*. Apenas no caso específico deste método, contamos com o auxílio do programa IBM SPSS *Statistics* versão 22 (SPSS Inc. Chicago, IL).

Ao final desta análise de agrupamento, comparou-se o resultado obtido por este método estatístico com a classificação obtida por meio do painel imuno-histoquímico. Assim, obteve-se o índice de concordância Kappa (k) entre os dois métodos utilizados na classificação dos tumores.

Para verificar a associação entre as variáveis de interesse e os tipos histológicos dos tumores, foi realizado o teste t de *Student* para as variáveis contínuas, com distribuição gaussiana, e o teste do Qui-quadrado ($n > 4$) ou o teste exato de Fisher ($n < 5$) para as variáveis categóricas.

Posteriormente, um modelo de regressão multivariado foi obtido para quantificar os relacionamentos independentes entre um ou mais fatores de interesse na chance de classificação dos tumores. A análise multivariada foi realizada por meio de regressão logística e foi iniciada somente com as variáveis que apresentaram valor de $p < 0,20$ na análise univariada. Após a obtenção do primeiro modelo, as variáveis foram sendo retiradas sequencialmente, de acordo com o teste de Hosmer e Lemeshow da razão de verossimilhança, que avalia a adequação dos modelos aninhados, ou seja, avalia se um modelo com menor número de variáveis tem um ajuste igual ao do modelo com maior número de variáveis. O modelo escolhido foi o modelo com menor número de variáveis que não diferia do modelo imediatamente anterior com maior número de variáveis. O estimador obtido foi o odds ratio (OR), ou seja, a chance de classificação pancreatobiliar dividida pela chance de classificação intestinal, considerando as categorias das variáveis.

A análise de sobrevida teve como variável dependente a ocorrência de óbito em relação ao tempo, o qual foi mensurado em meses. Nessa análise, foram excluídos os casos de óbitos de pacientes ocorridos em até 30 dias do pós-operatório.

A análise univariada foi realizada para selecionar as variáveis que se associaram ao óbito, o que foi feito por meio da diferença de curvas de Kaplan-Meier para cada variável separadamente. Os testes utilizados para aferir se havia diferença entre as curvas de sobrevivência foram os testes de Logrank, Wilcoxon e Tarone-Ware.

Um modelo de regressão multivariado também foi gerado para quantificar os relacionamentos entre uma ou mais variáveis de interesse na sobrevida dos pacientes. Foram utilizados a regressão de Cox e os mesmos procedimentos anteriormente descritos para obtenção do modelo multivariado final. No caso da sobrevida, o estimador obtido foi a razão de risco ou *hazard ratio* (HR), ou seja, a chance de óbito dividida pela chance de sobreviver ao longo de todo o espectro da curva de sobrevivência. A análise de resíduos de Schoenfeld foi realizada ao final para estimar o ajuste do modelo.

Calculou-se ainda o tempo médio de sobrevivência com o respectivo intervalo de confiança, o tempo mediano de sobrevivência com o respectivo intervalo interquartilico, o percentual de sobreviventes aos 12, 24, 36 e 60 meses e a densidade de incidência de óbito (taxa instantânea de mortalidade), geral e por categorias das variáveis de interesse.

Em todas as análises, o nível de significância considerado foi igual a 5% ($p < 0,05$) e os valores de significância inferiores a 10% foram considerados com tendência à significância estatística ($p < 0,10$).

No caso das análises de associação entre as variáveis de interesse e a classificação dos tumores, apenas aquelas com completitude superior a 70% foram incluídas.

Nas análises de sobrevida, apenas resultados cujas diferenças entre as curvas de Kaplan-Meier foram significativas ($p < 0,05$) ou com tendência a significância estatística ($p < 0,10$) foram mostradas.

4. RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DESCRITIVA DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

A **Tabela 3** contém características demográficas e clínicas dos 30 pacientes com adenocarcinoma da ampola de Vater estudados.

A idade dos pacientes variou de 30 a 79 anos, com média de 61,5 anos e desvio padrão igual a 11,8 anos. A mediana das idades foi 62 anos e IIQ = (54; 72), ou seja, 25% dos pacientes tinham menos de 54 anos de idade enquanto outros 25% tinham mais de 72 anos. O tabagismo e o etilismo estiveram ausentes na maior parte dos pacientes, atingindo apenas 30% e 10% dos casos, respectivamente.

Três pacientes do gênero feminino apresentavam história prévia de outra neoplasia. Uma teve um adenocarcinoma de cólon aos 60 anos de idade. As outras duas pacientes, uma de 48 e outra de 66 anos, tiveram adenocarcinomas de mama. A mais idosa, além do câncer de mama, já havia desenvolvido uma neoplasia cerebral. Uma outra paciente de 52 anos, três anos após ser operada, teve diagnosticado um carcinoma de mama.

Tabela 3: Variáveis demográficas e clínicas dos 30 pacientes com adenocarcinoma da ampola de Vater.

Variáveis	Total n (%)	Valor p
Idade em categorias		
<50	5 (16,7)	0,292
50 a 59	6 (20,0)	0,527
60 a 69	10 (33,3)	0,294
70 ou mais	9 (30,0)	0,527
Gênero		
Masculino	10 (33,3)	0,099*
Feminino	20 (66,7)	
Tabagismo		
Não	21 (70,0)	0,043**
Sim	9 (30,0)	
Etilismo		
Não	27 (90,0)	<0,001***
Sim	3 (10,0)	
Comorbidades		
Não	11 (36,7)	0,200
Sim	19 (63,3)	
História familiar		
Negativa	13 (50,0)	0,999
Positiva	13 (50,0)	
Câncer Prévio		
Não	27 (89,7)	<0,001***
Sim	3 (10,3)	

Nota: Foram aplicados testes exatos binominais para igualdade de proporções em cada categoria; * $p < 0,10$, ** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

As demais variáveis clínicas, cirúrgicas, laboratoriais e patológicas dos pacientes podem ser observadas na **Tabela 4**.

A operação mais realizada foi a gastroduodenopancreatectomia cefálica (83,3%). Em quatro casos (13,3%) realizou-se a duodenopancreatectomia cefálica com preservação pilórica. Um único caso foi tratado por ampulectomia por acesso laparotômico. Tratava-se de uma paciente do gênero feminino, de 72 anos de idade, sem comorbidades, com biópsia endoscópica evidenciando um adenoma de papila. O exame

do espécime cirúrgico revelou ser um adenocarcinoma da ampola de Vater do tipo intestinal.

Em todos os casos de gastroduodenopancreatectomia foi associada a linfadenectomia regional.

Durante o ato operatório, encontrou-se uma variação anatômica na origem da artéria hepática direita em 11 casos (36,7%). Nesses casos, a artéria hepática direita originava-se da artéria mesentérica superior.

A presença de cálculos biliares foi observada em outros 11 pacientes (36,7%).

A classificação do grau de invasão dos tumores, segundo o estadiamento TNM (**Anexo A**), foi T1 em seis (20%) casos, T2 em 14 (46,6%) casos, T3 em sete (23,3%) casos e T4 em três (10%) casos. Em nove (30%) casos, houve acometimento neoplásico linfonodal (N1). Quanto ao estadiamento, metade dos pacientes (15 casos) encontrava-se no estágio I, enquanto a outra metade encontrava-se nos estágios II (12 casos - 40%) e III (3 casos - 10%).

A mortalidade nos 30 dias após o procedimento cirúrgico foi de 13,3% (quatro casos). Três destes óbitos ocorreram por infecção abdominal e sepse secundários a fístulas anastomóticas e, em um caso, por isquemia mesentérica. Excluindo-se os quatro óbitos ocorridos no perioperatório, outros nove (34,6%) pacientes faleceram até o fim do acompanhamento. A causa da morte de todos estes nove pacientes relacionou-se a recidiva da doença.

Entre os 30 pacientes incluídos neste estudo, 17 (65,3%) permaneceram vivos ao seu final.

Tabela 4: Características clínicas, cirúrgicas, laboratoriais e patológicas dos 30 pacientes com adenocarcinoma da ampola de Vater.

Variáveis	Total n (%)	Valor p
Cálculos biliares		
Negativo	19 (63,3)	0,200
Positivo	11 (36,7)	
CA19.9		
<37	10 (47,6)	0,999
≥37	11 (52,4)	
CEA		
<5	15 (88,2)	0,002**
≥5	2 (11,8)	
Variação HD		
Não	19 (63,3)	0,200
Sim	11 (36,7)	
Classificação T		
1	6 (20,0)	0,651
2	14 (46,6)	<0,001***
3	7 (23,3)	0,651
4	3 (10,0)	0,171
Classificação N		
Negativo	21 (70,0)	0,043*
Positivo	9 (30,0)	
Operação		
GDP	25 (83,3)	<0,001***
DPPP	4 (13,3)	
Ampulectomia	1 (3,3)	
Estadiamento		
I	15 (50,0)	0,052*
II	12 (40,0)	0,436
III	3 (10,0)	0,007**
Óbito pós-operatório		
Não	26 (86,7)	<0,001***
Sim	4 (13,3)	
Óbito seguimento		
Não	17 (65,3)	0,116
Sim	9 (34,6)	

Nota: Foram feitos testes exatos binominais para igualdade de proporções em cada categoria;
* p<0,10, ** p<0,01, *** p<0,001.

4.2 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

A **Tabela 5** mostra o percentual de tumores positivos e negativos para cada um dos marcadores imuno-histoquímicos testados. As mucinas MUC1, MUC2 e MUC5AC revelaram-se positivas em 25 (83,3%), 13 (43,3%) e 15 (50%) casos, respectivamente. A expressão do CDX2 foi encontrada em 10 casos (33,3%). A citoqueratina CK7 foi positiva em 20 (66,7%) casos, enquanto a CK20 em 12 (40%) casos. A expressão da EpCAM foi identificada em 28 (93,3%) casos (**Figuras 5 a 8**).

Tabela 5: Características imuno-histoquímicas dos 30 pacientes com adenocarcinoma da Ampola de Vater.

Variáveis	Total n (%)	Valor p
MUC1		
Negativo	5 (16,6)	0,001**
Positivo	25 (83,3)	
MUC2		
Negativo	17 (56,6)	0,361
Positivo	13 (43,3)	
MUC5AC		
Negativo	15 (50,0)	0,999
Positivo	15 (50,0)	
CDX2		
Negativo	20 (66,7)	0,099*
Positivo	10 (33,3)	
CK7		
Negativo	10 (33,3)	0,099*
Positivo	20 (66,7)	
CK20		
Negativo	18 (60,0)	0,362
Positivo	12 (40,0)	
EpCAM		
Negativo	2 (6,7)	<0,001***
Positivo	28 (93,3)	

Nota: foram feitos testes exatos binominais para igualdade de proporções em cada categoria; * p<0,10, ** p<0,01, *** p<0,001.

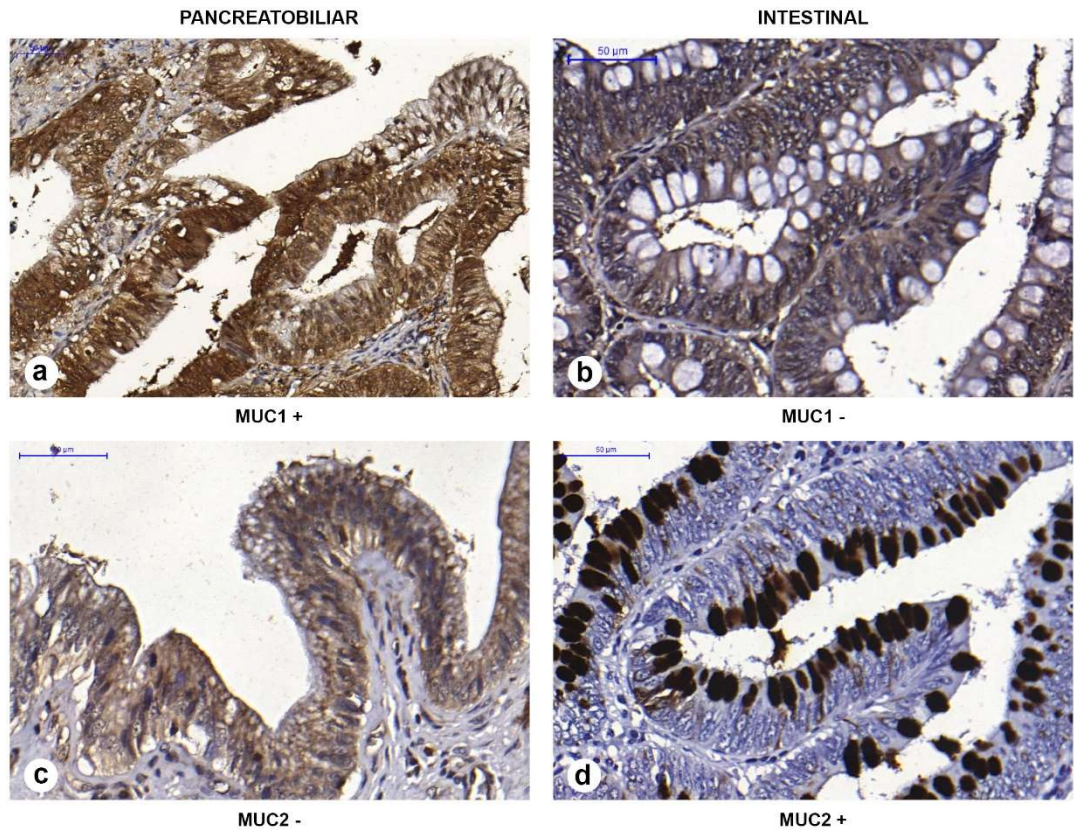


Figura 5: Expressão de MUC1 e MUC2 nos adenocarcinomas da ampola de Vater. **(a)** e **(c)**, tumor tipo pancreatobiliar MUC1+ **(a)** e MUC2- **(c)**. **(b)** e **(d)**, tumor tipo intestinal MUC1- **(b)** e MUC2+ **(d)**. A marcação da MUC1 é citoplasmática, difusa e granular como pode ser observado em **(a)**. A marcação da MUC2 é também citoplasmática e granular, porém densa e acentuada nas células caliciformes que podem ser vistas em coloração marrom-escuro em **(d)**.

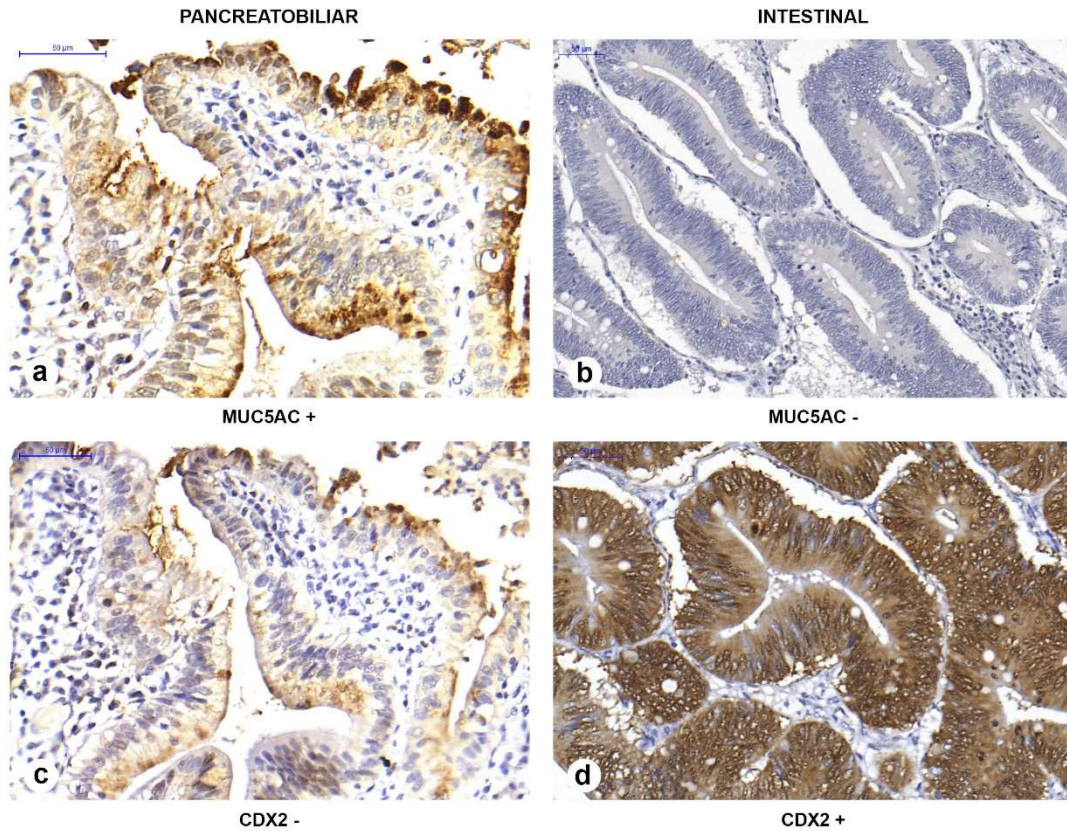


Figura 6: Expressão de MUC5AC e CDX2 nos adenocarcinomas da ampola de Vater. **(a)** e **(c)**, tumor tipo pancreatobiliar MUC5AC+ **(a)** e CDX2- **(c)**. **(b)** e **(d)**, tumor tipo intestinal MUC5AC- **(b)** e CDX2+ **(d)**. A marcação da MUC5AC é citoplasmática, granular e apical. Já a marcação do CDX2 é granular, difusa, mais densa no núcleo celular.

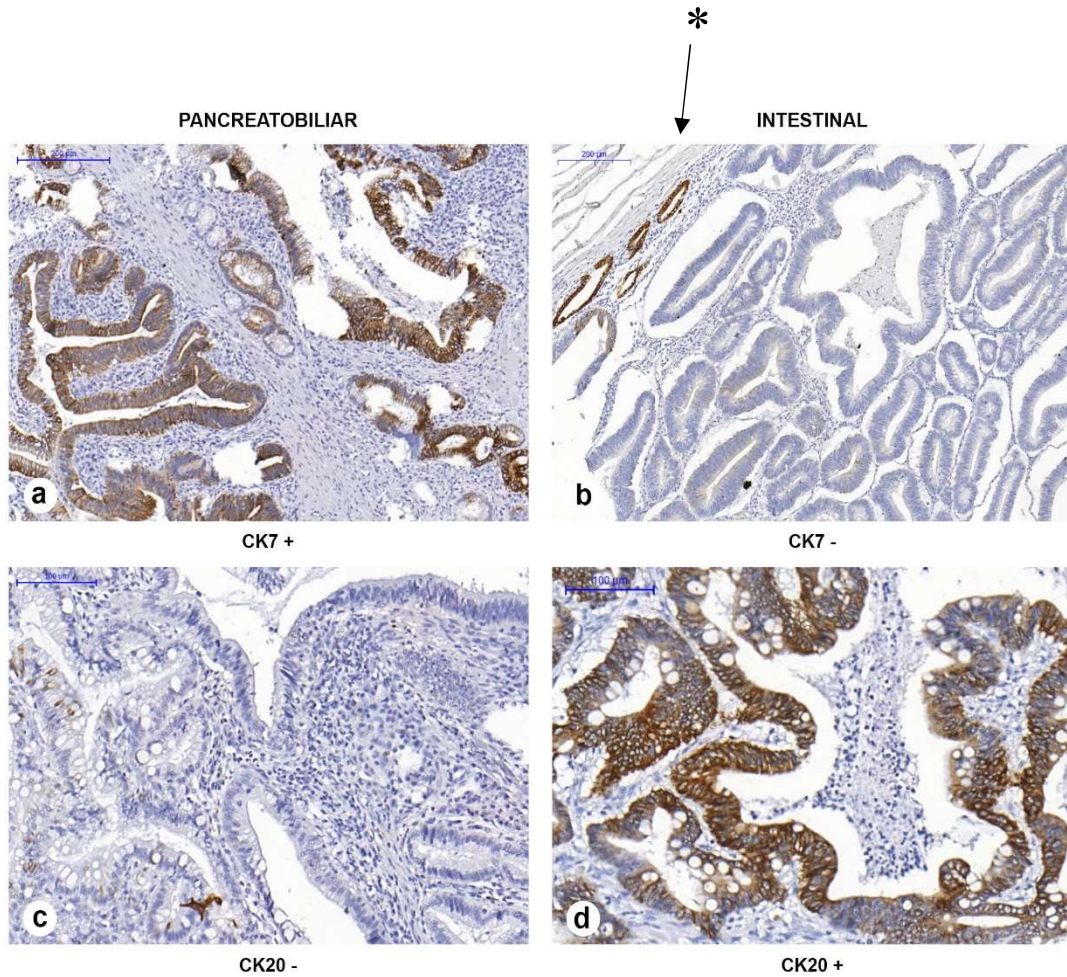


Figura 7: Expressão de CK7 e CK20 nos adenocarcinomas da ampola de Vater. (a) e (c), tumor tipo pancreatobiliar CK7+ (a) e CK20- (c). (b) e (d), tumor tipo intestinal CK7- (b) e CK20+ (d). Tanto as marcações da CK7 quanto da CK20 são granulares, difusas e citoplasmáticas. (*) observar o controle interno CK7+ no epitélio das glândulas biliares (b).

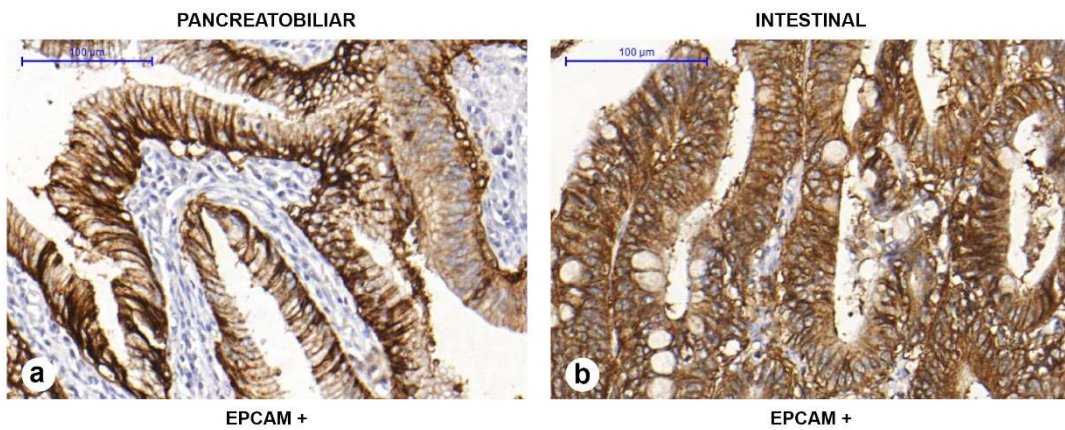


Figura 8: Expressão de EpCAM+ nos adenocarcinomas da ampola de Vater. **(a)**, tumor tipo pancreatobiliar; **(b)**, tumor tipo intestinal. A marcação da EpCAM é predominantemente superficial membranar.

4.3 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS TIPOS HISTOLÓGICOS E AS CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLINICOPATOLÓGICAS

4.3.1 Análise univariada

Entre os 30 adenocarcinomas da ampola de Vater, 21 (70,0%) foram do tipo pancreatobiliar e nove (30%) do tipo intestinal. A associação dos tipos histológicos destes tumores com as variáveis clínicas e demográficas pode ser vista na **Tabela 6**.

A relação entre a faixa etária dos pacientes e os tipos histológicos mostrou que o tumor intestinal acometeu pacientes com faixa etária superior ao tumor pancreatobiliar ($p < 0,05$). A média das idades dos pacientes com tumor do tipo intestinal foi de 68,5 anos, com mediana de 72 anos. Já os pacientes com tumor do tipo pancreatobiliar apresentaram uma média de idades igual a 58,5 anos e mediana de 62 anos. A paciente mais jovem da amostra, de 30 anos, apresentou um tumor do tipo pancreatobiliar.

Os tumores do tipo pancreatobiliar associaram-se mais ao tabagismo, ao etilismo, a variação anatômica da artéria hepática direita, a presença de comorbidades, a presença de história familiar positiva para outras neoplasias e a ocorrência prévia de outro tumor, distinto da ampola, porém sem significância estatística ($p > 0,05$).

Quanto ao gênero, a maior parte dos pacientes era constituída por mulheres e o tipo pancreatobiliar foi o mais comum em ambos os grupos, masculino e feminino. Entre os pacientes do gênero masculino, seis (60%) tumores eram do tipo pancreatobiliar e apenas 4 (40%) tumores era do tipo intestinal. Já entre as pacientes do gênero feminino, 15 (75%) tumores eram do tipo pancreatobiliar, enquanto apenas cinco (25%) eram do tipo intestinal.

O tabagismo esteve presente em apenas 30% dos pacientes dessa amostra e relacionou-se mais com os tumores do tipo pancreatobiliar. 66,7% dos tabagistas eram acometidos de tumores do tipo pancreatobiliar e 33,3% deles acometidos de tumores do tipo intestinal.

O etilismo também foi mais prevalente dentre os pacientes com tumores pancreatobiliares. Todos os três pacientes etilistas tiveram tumores deste tipo.

Dos 11 (36,6%) casos nos quais identificou-se variação anatômica da artéria hepática, sete (63,6%) casos eram de pacientes com tumores do tipo pancreatobiliar e quatro (36,4%) do tipo intestinal.

Dos pacientes que apresentavam comorbidades associadas, 68,4% tinham tumores do tipo pancreatobiliar.

Já dos 26 pacientes com dados sobre a história familiar, a metade possuía história positiva para outras neoplasias. Desta metade, 10 (76,9%) casos eram de familiares dos pacientes com tumores tipo pancreatobiliar e apenas três (23,1%) eram de familiares dos pacientes com tumores do tipo intestinal.

Tabela 6: Associação entre os tipos intestinal e pancreatobiliar e as variáveis demográficas e clínicas dos 30 pacientes com adenocarcinoma da ampola de Vater.

Variáveis	Classificação segundo painel imuno-histoquímico		Total	Valor p
	Intestinal	Pancreatobiliar		
	9 (30,0%)	21 (70,0%)	30 (100,0%)	
Idade (em anos)				
Média (DP)	68,5 (8,7)	58,5 (11,9)	61,5 (11,8)	0,031* (a)
Mediana (IIQ)	72 (64; 75)	62 (52; 66)	62 (54; 72)	0,046* (b)
Idade em categorias				
<50	0 (0,0)	5 (100,0)	5 (100,0)	0,022*
50 a 59	2 (33,3)	4 (66,7)	6 (100,0)	
60 a 69	1 (10,0)	9 (90,0)	10 (100,0)	
70 ou mais	6 (66,7)	3 (33,3)	9 (100,0)	
Gênero				
Masculino	4 (40,0)	6 (60,0)	10 (100,0)	0,331
Feminino	5 (25,0)	15 (75,0)	20 (100,0)	
Tabagismo				
Não	6 (28,6)	15 (71,4)	21 (100,0)	0,999
Sim	3 (33,3)	6 (66,7)	9 (100,0)	
Etilismo				
Não	9 (33,3)	18 (66,7)	27 (100,0)	0,534
Sim	0 (0,0)	3 (100,0)	3 (100,0)	
Variação anatômica				
HD				0,687
Não	5 (26,3)	14 (73,7)	19 (100,0)	
Sim	4 (36,4)	7 (63,6)	11 (100,0)	
Comorbidades				
Não	3 (27,3)	8 (72,7)	11 (100,0)	0,999
Sim	6 (31,6)	13 (68,4)	19 (100,0)	
História familiar				
Negativa	5 (30,5)	8 (61,5)	13 (100,0)	0,673
Positiva	3 (23,1)	10 (76,9)	13 (100,0)	
Câncer Prévio				
Não	9 (33,3)	18 (66,7)	27 (100,0)	0,534
Sim	0 (0,0)	3 (100,0)	3 (100,0)	

Notas: (a) teste de t de *Student*; (b) teste de proporções (exato de Fisher, com base no ponto de corte da mediana); para todas as demais variáveis foi utilizado teste exato de Fisher; * p<0,05.

A associação dos tipos histológicos dos tumores e as demais variáveis clínicopatológicas está disposta na **Tabela 7**.

As variáveis que estiveram significativamente ($p < 0,05$) associadas aos tipos histológicos foram o tipo de operação realizada, o acometimento linfonodal (N), o estadiamento (TNM), a invasão angiolinfática e a perineural. O tipo pancreatobiliar associou-se com estadiamentos mais avançados da doença, com invasão neoplásica linfonodal (N1) e com invasão angiolinfática e perineural tumoral.

A presença de cálculos biliares não foi significativa em nenhum tipo de tumor. Eles estiveram presentes em 33,3% dos casos de tumores do tipo intestinal e em 38,1% dos casos de tumores do tipo pancreatobiliar.

O mesmo ocorreu com a dosagem sérica do CA 19.9, a qual não se associou a nenhum tipo de tumor. A dosagem sérica deste marcador se alterou em metade dos casos de tumores do tipo pancreatobiliar e em 57,1% dos casos de tumores do tipo intestinal. Já os níveis séricos do CEA se alteraram em apenas 16,6% dos casos de tumores do tipo pancreatobiliar e em nenhum caso dos tumores do tipo intestinal.

Quanto ao tratamento cirúrgico, apenas em um caso dos 21 tumores do tipo pancreatobiliar foi optado pela técnica de duodenopancreatectomia cefálica com preservação do piloro. Em outros 3 casos, todos do tipo intestinal, também foi utilizada esta técnica.

Quanto ao grau de invasão tumoral, a maior parte dos tumores T1 era do tipo intestinal (66%). A partir de T2, o tipo pancreatobiliar passa a se sobrepôr, sendo responsável por 71,4% dos tumores T2, 85,7% dos tumores T3 e 100% dos tumores T4.

No grupo de tumores do tipo pancreatobiliar, 42,8% apresentavam linfonodos acometidos (N1). Eles foram responsáveis por todos os casos N1 deste estudo.

Dos casos de estadiamento I da doença, a maior parte era de tumores do tipo intestinal (53,3%). Nos estadiamentos mais avançados, II e III, o tipo pancreatobiliar foi o mais comum, com 91,7% e 100% dos casos, respectivamente. Os tumores do tipo pancreatobiliar apresentaram-se, portanto, com estadiamento TNM mais avançado do que os tumores do tipo intestinal, com 33,3% deles no estágio I, 52,3% no estágio II e 14,2% no estágio III. Dos tumores do tipo intestinal, por sua vez, 8 (88,8%) casos eram do estágio I e apenas um do estágio II.

Assim, nenhum tumor do tipo intestinal apresentou grau de invasão tumoral T4, acometimento neoplásico linfonodal (N1) ou foi classificado no estágio III da doença.

Com relação aos quatro óbitos ocorridos no período pós-operatório, até 30 dias após a operação de ressecção do tumor, não houve diferença entre os tipos, sendo que dois pacientes tinham tumores do tipo pancreatobiliar e os outros dois do tipo intestinal.

Durante o seguimento, houve mortalidade apenas entre os pacientes acometidos por tumores do tipo pancreatobiliar. Dos nove casos de óbitos, todos os casos eram do tipo pancreatobiliar.

Tabela 7: Associação entre os tipos intestinal e pancreatobiliar e as variáveis clínicas, cirúrgicas e patológicas dos 30 pacientes com adenocarcinoma da ampola de Vater.

Variáveis	Classificação segundo painel imuno-histoquímico		Total 30 (100,0%)	Valor p
	Intestinal 9 (30%)	Pancreatobiliar 21 (70%)		
Cálculos biliares				
Ausente	6 (31,6)	13 (68,4)	19 (100,0)	0,999
Presente	3 (27,3)	8 (72,7)	11 (100,0)	
CA19.9				
<37	3 (30,0)	7 (70,0)	10 (100,0)	0,999
≥37	4 (36,4)	7 (63,6)	11 (100,0)	
CEA				
<5	5 (33,3)	10 (66,7)	15 (100,0)	0,999
≥5	0 (0,0)	2 (100,0)	2 (100,0)	
Operação				
GDP	5 (20,0)	20 (80,0)	25 (100,0)	0,019*
DPPP	3 (80,0)	1 (20,0)	4 (100,0)	
Ampulectomia	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	
Classificação T				
1	4 (66,6)	2 (33,3)	6 (100,0)	0,191
2	4 (28,6)	10 (71,4)	14 (100,0)	
3	1 (14,3)	6 (85,7)	7 (100,0)	
4	0 (0,0)	3 (100,0)	3 (100,0)	
Classificação N				
Negativo	9 (42,9)	12 (57,1)	21 (100,0)	0,029*
Positivo	0 (0,0)	9 (100,0)	9 (100,0)	
Estadiamento				
I	8 (53,3)	7 (46,7)	15 (100,0)	0,022*
II	1(8,3)	11 (91,7)	12 (100,0)	
III	0 (0,0)	3 (100,0)	3 (100,0)	
Invasão angiolímfática				
Ausente	8 (61,54)	5 (38,46)	13 (100,00)	0,002*
Presente	1 (5,88)	16 (94,12)	17 (100)	
Invasão perineural				
Ausente	8 (44,44)	10 (55,5)	18 (100,00)	0,049*
Presente	1 (8,33)	11 (91,6)	12 (100,00)	
Óbito pós-operatório				
Não	7 (26,9)	19 (73,1)	26 (100,0)	0,563
Sim	2 (50,0)	2 (50,0)	4 (100,0)	
Óbito seguimento				
Não	7 (41,1)	10 (58,8)	17 (100,0)	0,357
Sim	0 (0,0)	9 (100,0)	9 (100,0)	

Notas: Para todas as variáveis foi utilizado teste exato de Fisher; * p<0,05.

4.3.2 Análise multivariada

A única variável independente que permaneceu no modelo multivariado associada significativamente ao tipo histológico, no caso o tipo pancreatobiliar, foi a invasão angiolinfática ($p=0,005$), com $OR=17$ (IC 95%, 2,33 a 123,83). Portanto, a chance de um tumor ser do tipo pancreatobiliar entre aqueles com invasão angiolinfática foi 17 vezes a chance de ser pancreatobiliar entre aqueles sem invasão angiolinfática.

4.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS TIPOS HISTOLÓGICOS E A EXPRESSÃO DOS MARCADORES IMUNO-HISTOQUÍMICOS

4.4.1 Análise univariada

A associação dos tipos histológicos dos adenocarcinomas da ampola de Vater e os imunomarcadores utilizados está disposta na **Tabela 8**.

Houve associação significativa ($p<0,05$) entre os tipos histológicos dos tumores e os imunomarcadores utilizados, exceto no caso da EpCAM. O tipo pancreatobiliar associou-se com MUC1, MUC5AC e CK7. Já o tipo intestinal associou-se com MUC2, CDX2 e CK20.

MUC1 foi positiva em 44,4% dos tumores do tipo intestinal e em todos os casos dos tumores do tipo pancreatobiliar. MUC 2 foi positiva em todos os tumores do tipo intestinal e em apenas 19,0% dos casos dos tumores do tipo pancreatobiliar.

MUC5AC foi positiva em 11,1% dos casos dos tumores do tipo intestinal e em 66,6% dos casos dos tumores do tipo pancreatobiliar. 93,3% dos tumores que expressavam MUC5AC eram do tipo pancreatobiliar.

CDX2 teve grande relação com os tumores do tipo intestinal. Esse fator foi positivo em todos os casos do tipo intestinal e, apenas, em um caso do tipo pancreatobiliar. 90% dos tumores que expressavam CDX2 eram do tipo intestinal.

As citoqueratinas, assim como as mucinas, também se dividiram entre os tipos de tumores, sendo a CK7 fortemente relacionada com o tipo histológico pancreatobiliar e a CK20 com o tipo intestinal. CK7 não foi expressa em nenhum tumor

do tipo intestinal, já os tumores do tipo pancreatobiliar a expressaram em 95,2% dos casos. Já a CK20, inversamente, expressou-se em todos os casos de tumor do tipo intestinal, sendo ainda negativa em grande parte dos casos dos tumores do tipo pancreatobiliar (85,7%). Assim, todos os tumores que expressaram CK7 eram do tipo pancreatobiliar e 75% dos tumores que expressaram CK20 eram do tipo intestinal.

A molécula de adesão EpCAM foi expressa em todos os casos do tipo intestinal e em 19 (90,4%) dos 21 casos dos tumores do tipo pancreatobiliar, não sendo, desta forma, associada a nenhum tipo de tumor especificamente.

Tabela 8: Associação entre os tipos histológicos e os imunomarcadores dos 30 adenocarcinomas da ampola de Vater.

Variáveis	Classificação segundo painel		Total 30 (100,0%)	Valor p
	Intestinal 9 (30%)	Pancreatobiliar 21 (70%)		
MUC1				
Negativo	5 (100,0)	0 (0,0)	5 (100,0)	<0,001***
Positivo	4 (16,0)	21 (84,0)	25 (100,0)	
MUC2				
Negativo	0 (0,0)	17 (100,0)	17 (100,0)	0,001**
Positivo	9 (69,2)	4 (30,7)	13 (100,0)	
MUC5AC				
Negativo	8 (53,3)	7 (46,7)	15 (100,0)	0,014*
Positivo	1 (6,7)	14 (93,3)	15 (100,0)	
CDX2				
Negativo	0 (0,0)	20 (100,0)	20 (100,0)	<0,001***
Positivo	9 (90,0)	1 (10,0)	10 (100,0)	
CK7				
Negativo	9 (90,0)	1 (10,0)	10 (100,0)	<0,001***
Positivo	0 (0,0)	20 (100,0)	20 (100,0)	
CK20				
Negativo	0 (0,0)	18 (100,0)	18 (100,0)	<0,001***
Positivo	9 (75,0)	3 (25,0)	12 (100,0)	
EpCAM				
Negativo	0 (0,0)	2 (100,0)	2 (100,0)	0,999
Positivo	9 (32,1)	19 (67,9)	28 (100,0)	

Notas: Para todas as variáveis foi utilizado teste exato de Fisher; * p<0,05; **p<0,01; p<***0,0001.

4.4.2 Análise pelo método de agrupamentos semelhantes (two step cluster) dos marcadores imuno-histoquímicos

O método de agrupamentos semelhantes (*two-step cluster*) classificou os 30 adenocarcinomas da ampola de Vater em dois grupos, baseado nos dados coletados do perfil imuno-histoquímico dos tumores estudados. Em um grupo (*cluster 1*) foram alocados 21 casos e em outro grupo (*cluster 2*) nove casos.

As **Figuras 9 e 10** mostram a frequência de cada marcador imuno-histoquímico, em porcentagem e em valor absoluto, respectivamente, nestes dois grupos.

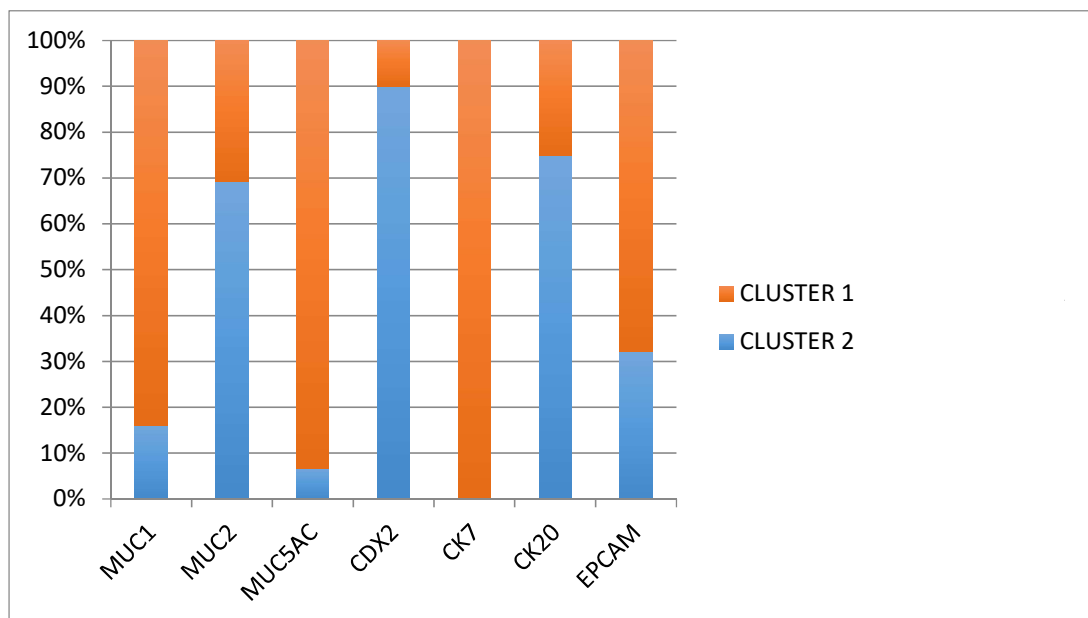


Figura 9: Frequência, em porcentagem, da expressão dos marcadores imunohistoquímicos nos dois grupos (clusters) de pacientes.

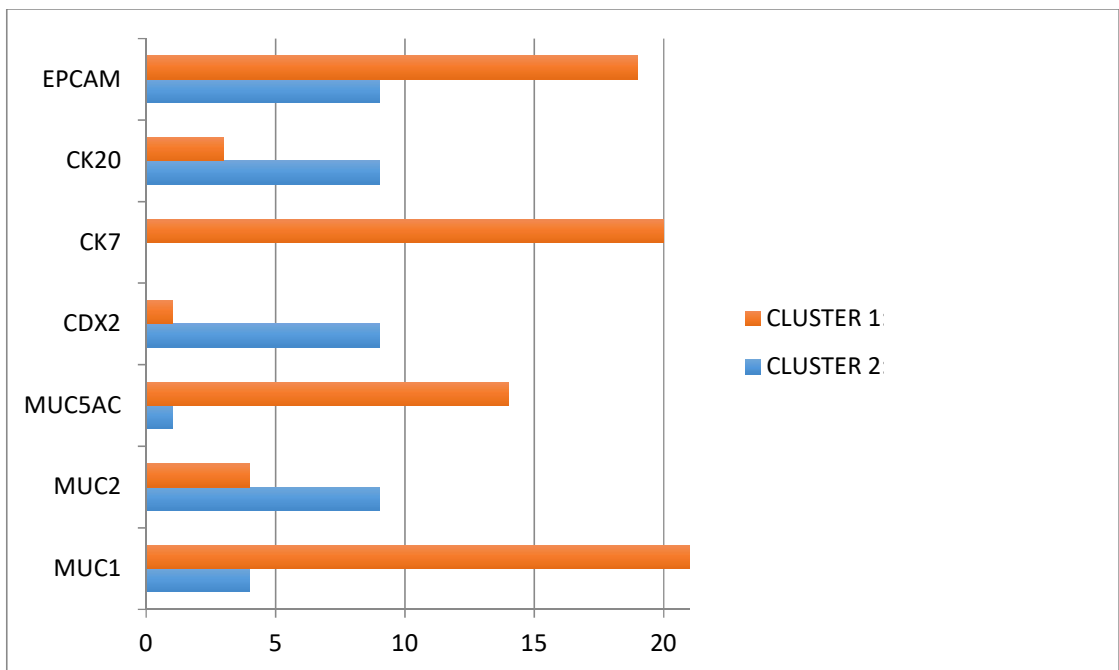


Figura 10: Distribuição da frequência, em número de casos, da expressão dos marcadores imuno-histoquímicos nos dois grupos (clusters) de pacientes.

Este método estatístico é capaz de aferir quais dados específicos – no caso, quais imunomarcadores – foram mais relevantes para a determinação dos grupos.

A **Figura 11** mostra a relevância de cada marcador imuno-histoquímico como preditor, calculada pelo método.

Os imunomarcadores CK7 e CDX2 foram os que melhor discriminaram os tumores entre os grupos. Todos os tumores que expressaram CK7 foram alocados no grupo (*cluster*) 1 e nenhum destes casos foi alocado no grupo (*cluster*) 2. A quase totalidade dos tumores que expressaram CDX2 foram alocados no grupo (*cluster*) 2.

Os graus de importância dos marcadores CK7 e CDX2, como preditores, calculados pelo método estatístico, foram iguais a 1,0, os maiores valores encontrados. A citoqueratina CK20 e as mucinas, MUC1 e MUC2, vieram na sequência, com graus de importância calculados iguais a 0,77, 0,71 e 0,68, respectivamente. EpCAM e MUC5AC não atingiram 0,5 de importância como preditores.

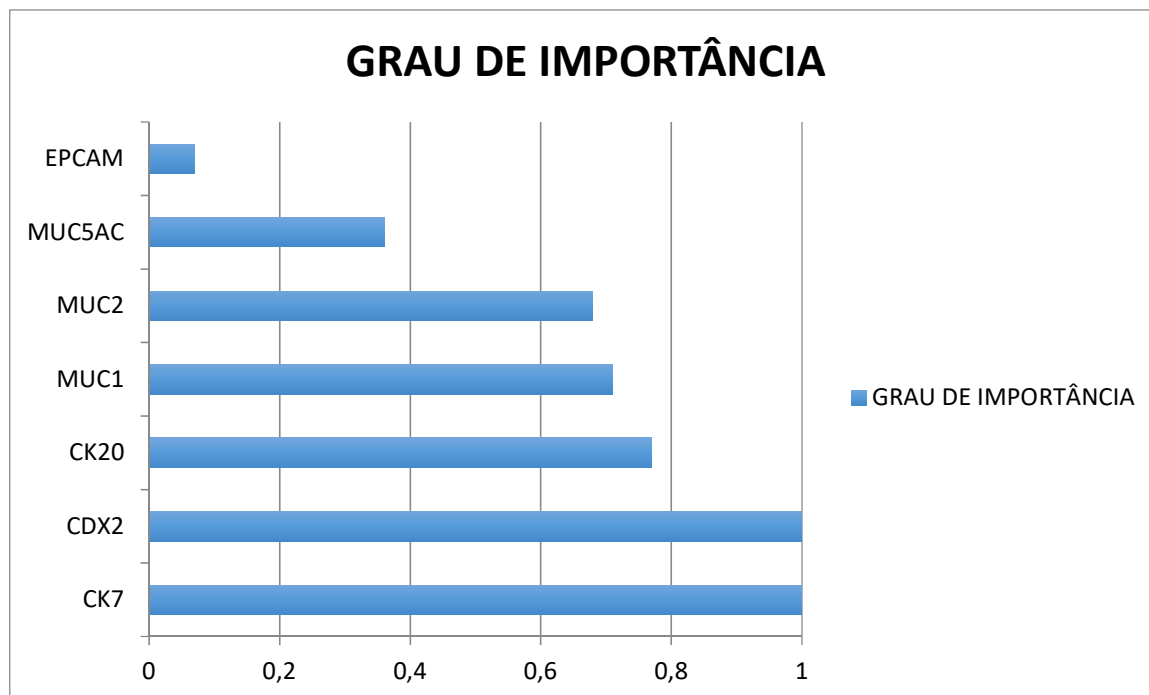


Figura 11: Importância de cada marcador imunohistoquímico como preditor na conformação dos grupos (*clusters*).

Ao analisarmos os dados dos grupos 1 e 2 formados automaticamente pelo método estatístico dos agrupamentos baseados na semelhança da expressão dos diversos imunomarcadores e compararmos estes grupos com a classificação realizada pelo painel imunohistoquímico, concluímos que este método foi capaz de classificar os tumores da ampola de Vater ao alocar no grupo (cluster) 1 os 21 tumores do tipo pancreatobiliar e no grupo (cluster) 2 os nove tumores do tipo intestinal da amostra, como veremos adiante.

4.5 ANÁLISE DA CONCORDÂNCIA ENTRE OS MÉTODOS UTILIZADOS NA CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORES: IMUNO-HISTOQUÍMICA E AGRUPAMENTOS SEMELHANTES (CLUSTER)

Quando se comparou os resultados da classificação realizada pelo patologista (baseada no painel imunohistoquímico) com o estatístico (*two step cluster*), a concordância foi alcançada em todos os casos, sendo a estatística Kappa (k) igual a 1,0.

A **Tabela 9** mostra os agrupamentos (*clusters*) 1 e 2 formados, levando-se em consideração, exclusivamente, a similaridade dos marcadores imuno-histoquímicos expressados, coincidentes com a classificação histológica em tipo pancreatobiliar e intestinal.

Tabela 9: Classificação do tipo histológico dos adenocarcinomas da ampola de Vater pela imuno-histoquímica e pelo método estatístico (agrupamentos semelhantes).

Imunomarcadores expressados	Frequência (%)	Classificação	
		Grupo (<i>cluster</i>)	Imuno-histoquímica
MUC2;CDX2,CK20,EpCAM	6(23,3)	2	Intestinal
MUC1;CK7;EpCAM	5(16,7)	1	Pancreatobiliar
MUC1;CK7;CK20;EpCAM	1(3,3)	1	Pancreatobiliar
MUC1;CDX2	1(3,3)	1	Pancreatobiliar
MUC1;MUC5AC;CK7	1(3,3)	1	Pancreatobiliar
MUC1;MUC5AC;CK7;EpCAM	7(21,3)	1	Pancreatobiliar
MUC1;MUC5AC;CK7;CK20;EpCAM	2(6,7)	1	Pancreatobiliar
MUC1;MUC2;CDX2;CK20;EpCAM	2(6,7)	2	Intestinal
MUC1;MUC2;MUC5AC;CK7;EpCAM	4(10,0)	1	Pancreatobiliar
MUC1;MUC2;MUC5AC;CDX2;CK20;EpCAM	1(3,3)	2	Intestinal
Total	30(100,0)		

Notas: Grupo 1 – tipo pancreatobiliar, grupo 2 – tipo intestinal.

4.6 ANÁLISE DA DENSIDADE DE INCIDÊNCIA DOS ÓBITOS E DA SOBREVIDA

Ocorreram quatro (13,3%) óbitos nos 30 primeiros dias das operações de ressecção dos TAV. Estes casos foram excluídos dos cálculos de sobrevida, tendo em vista que a causa destes óbitos se relacionou diretamente à operação realizada e não à

doença propriamente dita. Outros nove (34,6%) pacientes morreram durante o seguimento, antes de completarem cinco anos de sobrevida.

A densidade de incidência de óbito, a sobrevida média e mediana, e o percentual de sobreviventes aos 12, 24, 36 e 60 meses, de acordo com as variáveis que se revelaram fatores de impacto significativos ($p < 0,05$) ou com tendência a significância ($p < 0,10$) na sobrevida dos pacientes são mostradas na **Tabela 10**.

A densidade de incidência geral de óbitos no nosso seguimento de cinco anos foi de 9,5 óbitos por 1000 pacientes-meses. As maiores densidades ocorreram entre os pacientes com tumores T4 e entre aqueles com doença em estágio III. Dentre eles, a densidade de incidência de óbitos atingiu 111 óbitos por 1000 pacientes-meses.

A sobrevida média global dos pacientes foi de 32,3 meses, com mediana de sobrevida de 27,5 meses (IIQ = 18; 48). Os percentuais de sobreviventes em 12, 24, 36 e 60 meses de acompanhamento foram 87,8%, 75,2%, 69,9% e 65,38% respectivamente.

Na análise estatística univariada, os fatores prognósticos associados à sobrevida geral dos pacientes com significância estatística ($p < 0,05$) foram a faixa etária, o grau de invasão tumoral (T), o acometimento linfonodal (N), o estadiamento (TNM), a invasão angiolinfática e a invasão perineural.

Os pacientes com idade inferior a 40 anos tiveram sobrevida global inferior aos demais pacientes de outras faixas etárias.

Com relação ao grau de invasão tumoral (T), observou-se que quanto maior o estadiamento T, menor foi a sobrevida. Para pacientes com tumores T1 a sobrevida foi em média de 50,4 meses, com mediana de 48 meses. Já a sobrevida média dos pacientes com tumores T2 e T3 foi de 32,7 (mediana de 25) meses e 29,9 (mediana de 24) meses, respectivamente. Os três casos com classificação T4 tiveram a menor sobrevida, de apenas seis meses.

Os pacientes com metástases linfonodais (N1) apresentaram uma sobrevida média de apenas 20,9 meses, com mediana de 20 meses; enquanto os pacientes sem este acometimento (N0) apresentaram uma sobrevida média maior, de 38,3 meses, com mediana de 38 meses.

Os pacientes com tumores em estágio I sobreviveram 41,5 meses em média. Já aqueles com tumores no estágio III sobreviveram apenas 6 meses.

A presença de invasões angiolinfática e perineural reduziram a sobrevida média dos pacientes de 44,4 meses para 24,7 meses e de 41,3 meses para 21,8 meses, respectivamente.

O tipo histológico dos tumores e os imunomarcadores CK7 e CDX2 foram fatores prognósticos com tendência a significância estatística ($p < 0,10$).

O tipo pancreatobiliar, muito associado a estadiamentos mais avançados, a invasões angiolinfáticas, perineurais e linfonodais, impactou negativamente na sobrevida. A sobrevida média dos pacientes com tumores deste tipo histológico foi de apenas 29,9 meses, com mediana de 24 meses. Já o tempo médio de sobrevivência dos pacientes com tumores do tipo intestinal foi de 38,6 meses, com mediana de 48 meses.

A citoqueratina CK7 revelou-se um fator de mau prognóstico. Os pacientes com tumores CK7+ tiveram uma sobrevida média de 30,3 meses, com mediana de 24 meses, enquanto aqueles com tumores CK7- tiveram uma sobrevida média de 36,8 meses, com mediana de 39 meses.

O fator de transcrição CDX2, por sua vez, revelou-se um fator de bom prognóstico. Os pacientes com tumores CDX2+ apresentaram uma sobrevida média de 36,8 meses, com mediana de 39 meses, enquanto aqueles com tumores CDX2- apresentaram sobrevida média de 30,3 meses, com mediana de 24 meses.

As **Figuras de 12 a 21** mostram as curvas de sobrevida, pelo método de Kaplan-Meier, global e de acordo com as variáveis que estiveram associadas à sobrevida dos pacientes.

Na análise estatística multivariada, em que se levou em consideração as variáveis de estudo agrupadas, apenas o acometimento neoplásico linfonodal (N1) teve impacto significativo na sobrevida dos pacientes. A razão de risco (*hazard ratio*) obtida foi de $HR = 9,03$ ($p = 0,009$).

Tabela 10: Densidade de incidência de óbito, sobrevida média e mediana, e percentual de sobreviventes aos 12, 24, 36 e 60 meses, de acordo com as variáveis de impacto na sobrevida dos pacientes com adenocarcinoma da ampola de Vater.

Variáveis	Densidade de incidência do óbito/Taxa de mortalidade (por mil pacientes-meses)	Sobrevivência (tempo em meses)		Percentual de Sobreviventes			
		Média (DP)	Mediana (IIQ)	12 Meses	24 Meses	36 Meses	60 Meses
Total	9,5	32,3 (19,9)	27,5 (18; 48)	87,8	75,2	69,9	65,3
Idade							
Até 49 anos	35,4	22,6 (22,4)	16 (6; 25)	60,0	40,0	20,0	20,0
50 a 59 anos	0,0	43 (13,6)	47 (36; 48)	100,0	100,0	100,0	100,0
60 a 69 anos	21,4	23,4 (14,7)	20 (12; 34)	86,7	57,8	57,8	0,0
70 anos ou mais	0,0	40,5 (22,2)	48 (24; 60)	100,0	100,0	100,0	100,0
Estadiamento T							
1	0,0	50,4 (10,0)	48 (48; 60)	100,0	100,0	100,0	100,0
2	8,3	32,7 (18,8)	25 (21; 48)	100,0	90,0	75,0	53,6
3	14,4	29,9 (19,2)	24 (16; 47)	85,7	57,1	57,1	57,1
4	111,1	6 (0,0)	6 (6; 6)	20,0	20,0	20,0	20,0
Estadiamento N							
Negativo	3,1	38,3 (19,0)	38 (24; 60)	100,0	100,0	87,5	87,5
Positivo	31,9	20,9 (17,1)	20 (6; 25)	64,7	51,8	34,5	0,0
Estadiamento TNM							
I	0,0	41,5 (19,1)	48 (27; 60)	100,0	100,0	100,0	100,0
II	18,6	29,4 (16,5)	24 (18; 47)	90,9	63,6	50,9	25,5
III	111,1	6 (0,0)	6 (6; 6)	20,0	20,0	20,0	20,0
Invasão angiolinfática							
Negativo	0,0	44,4 (19,6)	48 (36; 60)	100,0	100,0	100,0	100,0
Positivo	20,3	24,7 (16,4)	22 (11; 34)	80,7	60,5	50,4	25,2
Invasão perineural							
Negativo	1,7	41,3 (17,9)	48 (25; 60)	100,0	100,0	90,9	90,9
Positivo	26,8	21,8 (17,2)	19 (6; 27)	73,9	64,7	46,2	23,1
Expressão de CK7							
Negativa	0,0	36,8 (20,9)	39 (24; 54)	100,0	100,0	100,0	100,0
Positiva	14,7	30,3 (19,7)	24 (16; 48)	82,9	65,1	57,9	45,1
Expressão de CDX2							
Negativa	14,7	30,3 (19,7)	24 (16; 48)	82,9	65,1	57,9	45,1
Positiva	0,0	36,8 (20,9)	39 (24; 54)	100,0	100,0	100,0	100,0
Classificação							
Intestinal	0,0	38,6 (21,9)	48 (24; 60)	100,0	100,0	100,0	100,0
Pancreatobiliar	14,1	29,9 (19,2)	24 (16; 48)	78,9	63,1	57,9	52,6

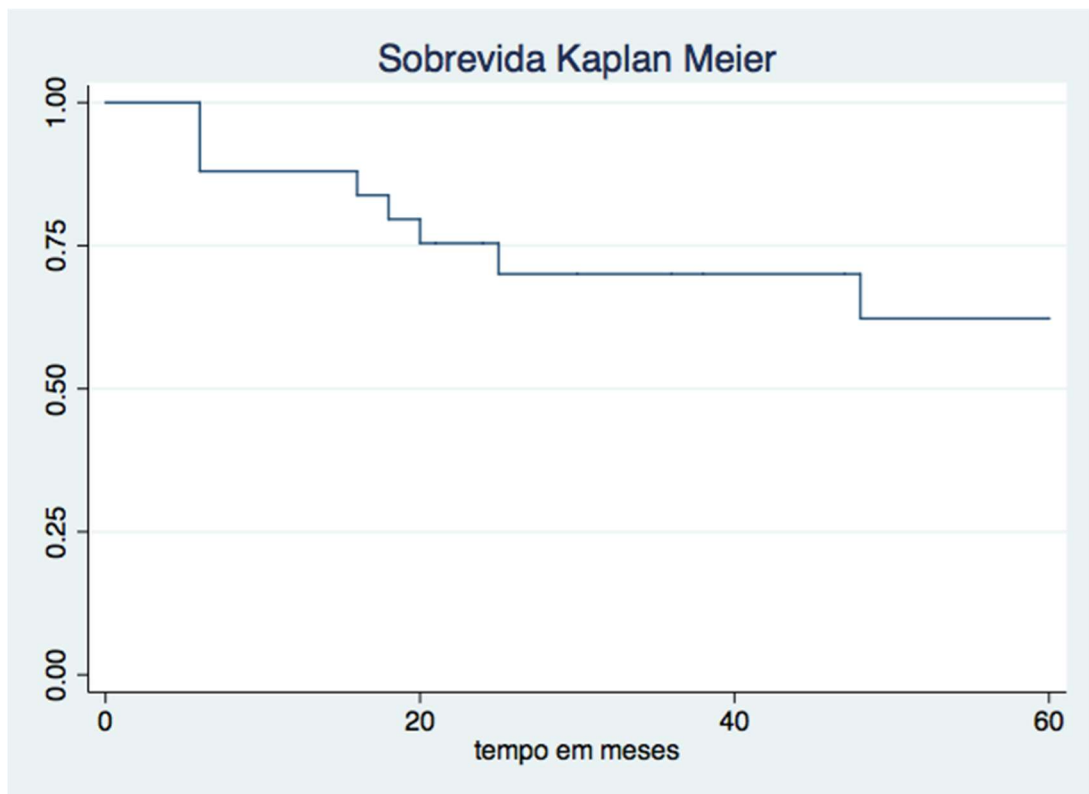


Figura 12: Curva de Kaplan-Meier da sobrevida global dos 26 pacientes com adenocarcinoma da ampola de Vater.

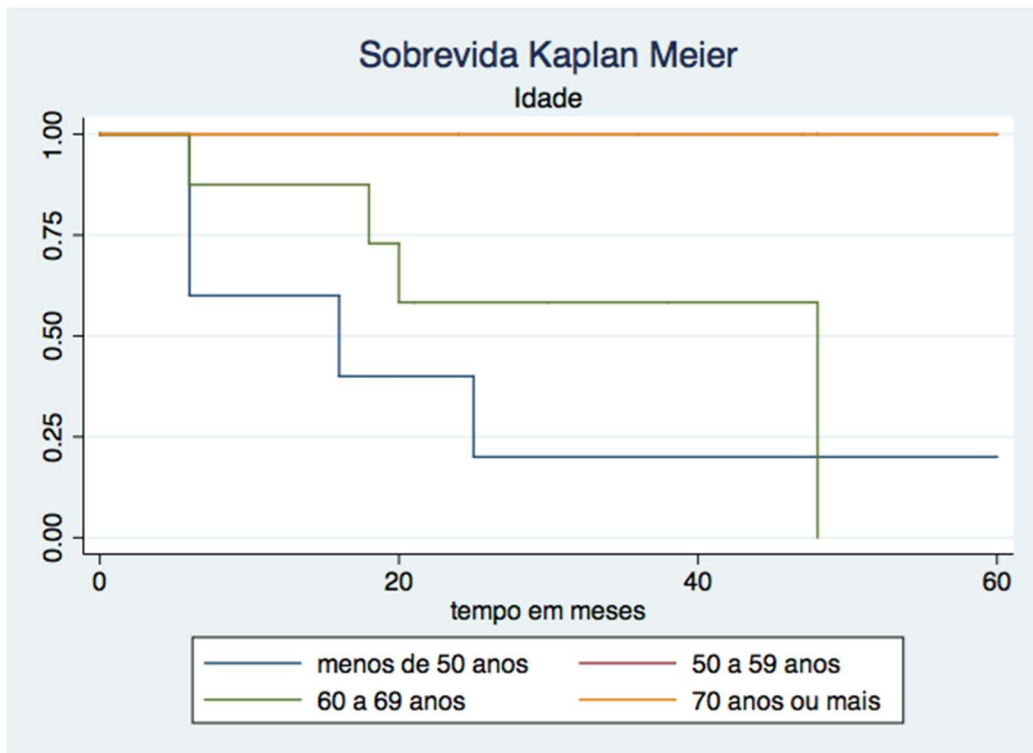


Figura 13: Curva de Kaplan-Meier da sobrevida dos 26 pacientes com adenocarcinoma da ampola de Vater segundo a idade. Teste de igualdade de curvas: Logrank ($p=0,012$), Wilcoxon ($p=0,007$), Tarone Ware ($p=0,007$).

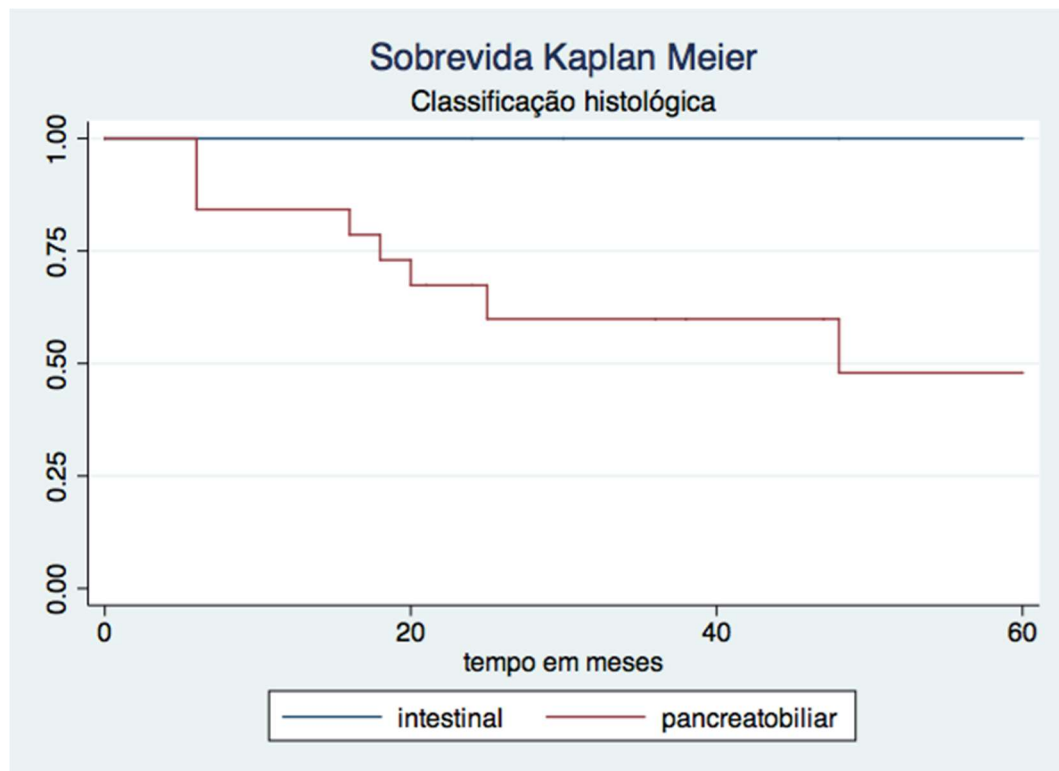


Figura 14: Curva de Kaplan-Meier da sobrevida dos 26 pacientes com adenocarcinoma da ampola de Vater segundo a classificação histológica. Teste de igualdade de curvas: Logrank ($p=0,180$), Wilcoxon ($p=0,096$), Tarone Ware ($p=0,112$).

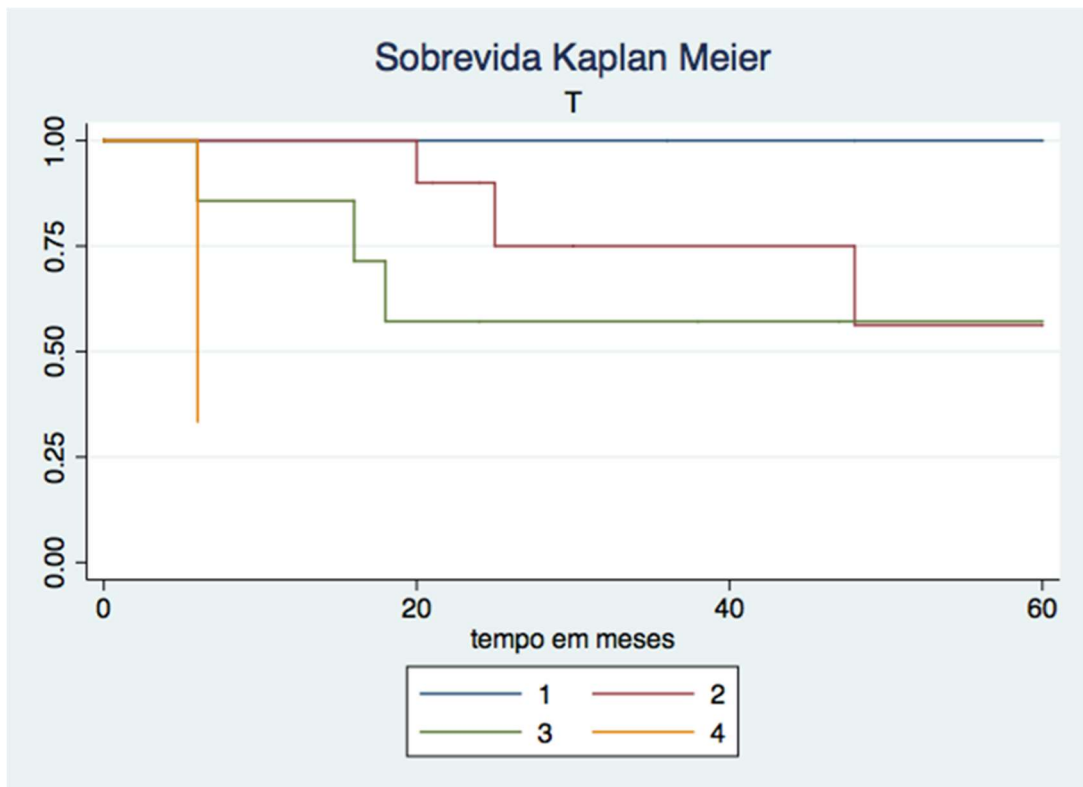


Figura 15: Curva de Kaplan-Meier da sobrevida dos 26 pacientes com adenocarcinoma da ampola de Vater segundo o grau de invasão tumoral (T) da classificação TNM do estadiamento AJCC. Teste de igualdade de curvas: Logrank ($p=0,013$), Wilcoxon ($p=0,007$), Tarone Ware ($p=0,009$).

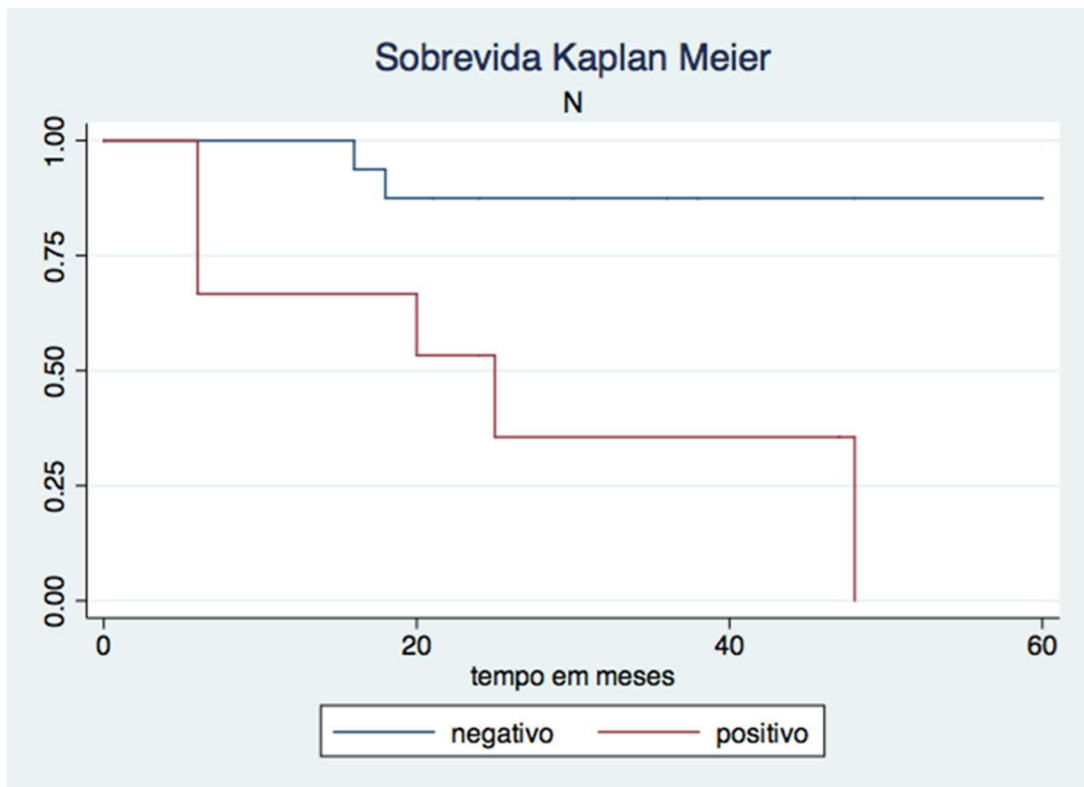


Figura 16: Curva de Kaplan-Meier da sobrevivência dos 26 pacientes com adenocarcinoma da ampola de Vater segundo o acometimento linfonodal (N) da classificação TNM do estadiamento AJCC. Teste de igualdade de curvas: Logrank ($p=0,002$), Wilcoxon ($p=0,006$), Tarone Ware ($p=0,003$).

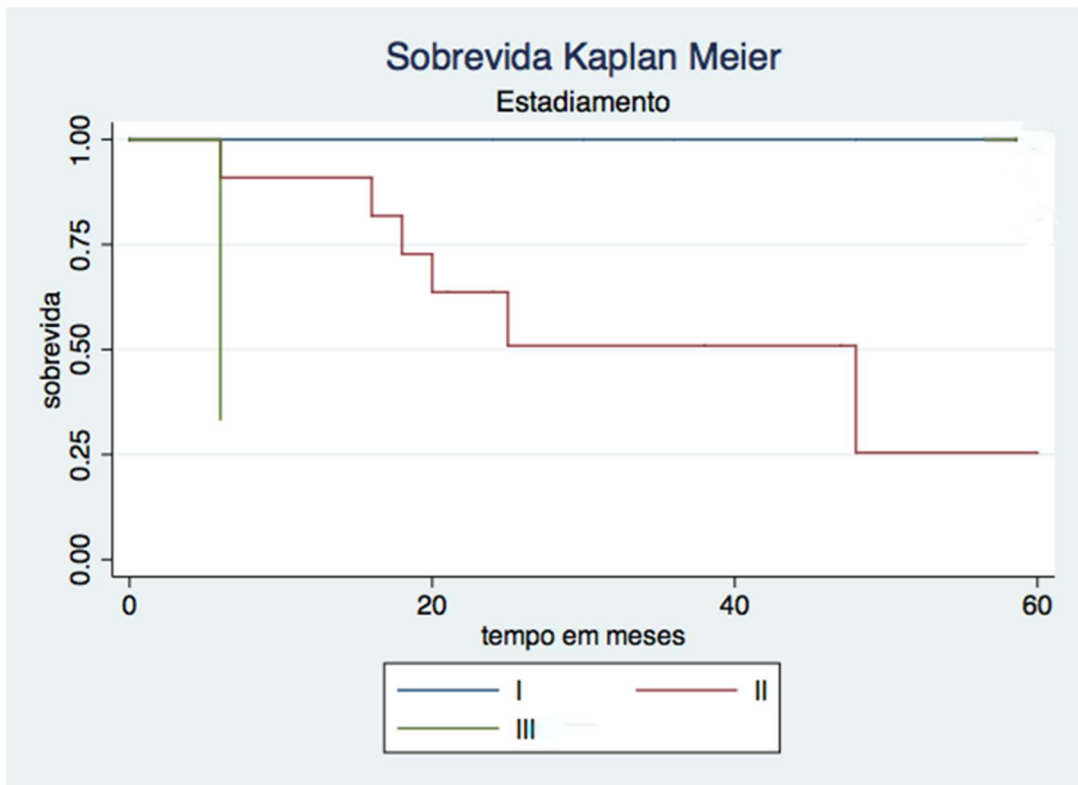


Figura 17: Curva de Kaplan-Meier da sobrevivência dos 26 pacientes com adenocarcinoma da ampola de Vater segundo o estadiamento TNM AJCC. Teste de igualdade de curvas: Logrank ($p=0,0005$), Wilcoxon ($p=0,0008$), Tarone Ware ($p=0,0006$).

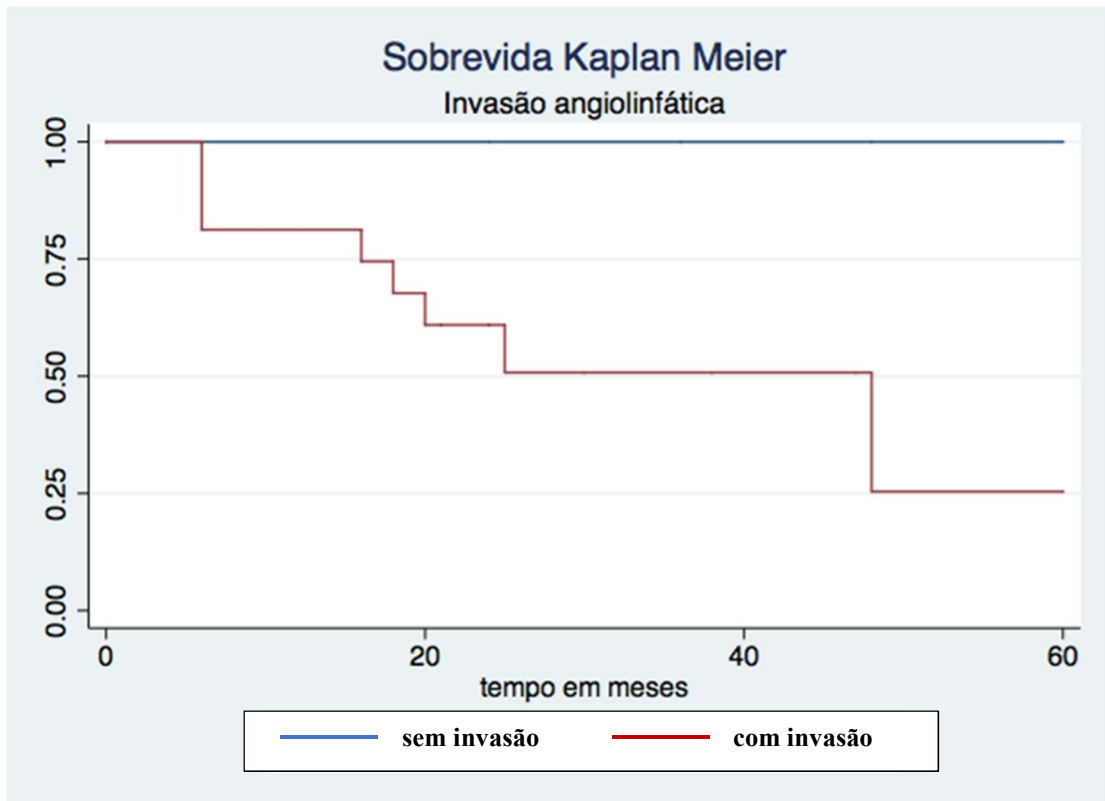


Figura 18: Curva de Kaplan-Meier da sobrevida dos 26 pacientes com adenocarcinoma da ampola de Vater segundo a invasão angiolinfática. Teste de igualdade de curvas: Logrank ($p=0,0104$), Wilcoxon ($p=0,0136$), Tarone Ware ($p=0,0104$).

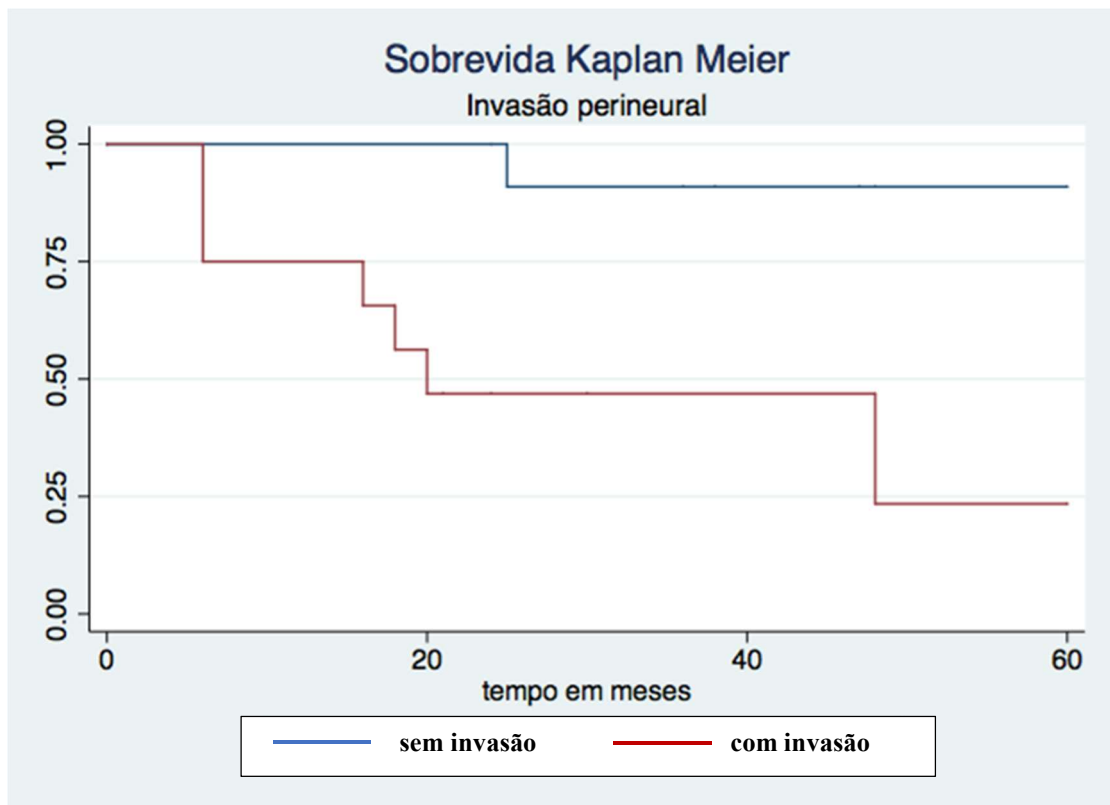


Figura 19: Curva de Kaplan-Meier da sobrevivência dos pacientes com adenocarcinoma da ampola de Vater segundo a invasão perineural. Teste de igualdade de curvas: Logrank ($p=0,0046$), Wilcoxon ($p=0,0032$), Tarone Ware ($p=0,0031$).

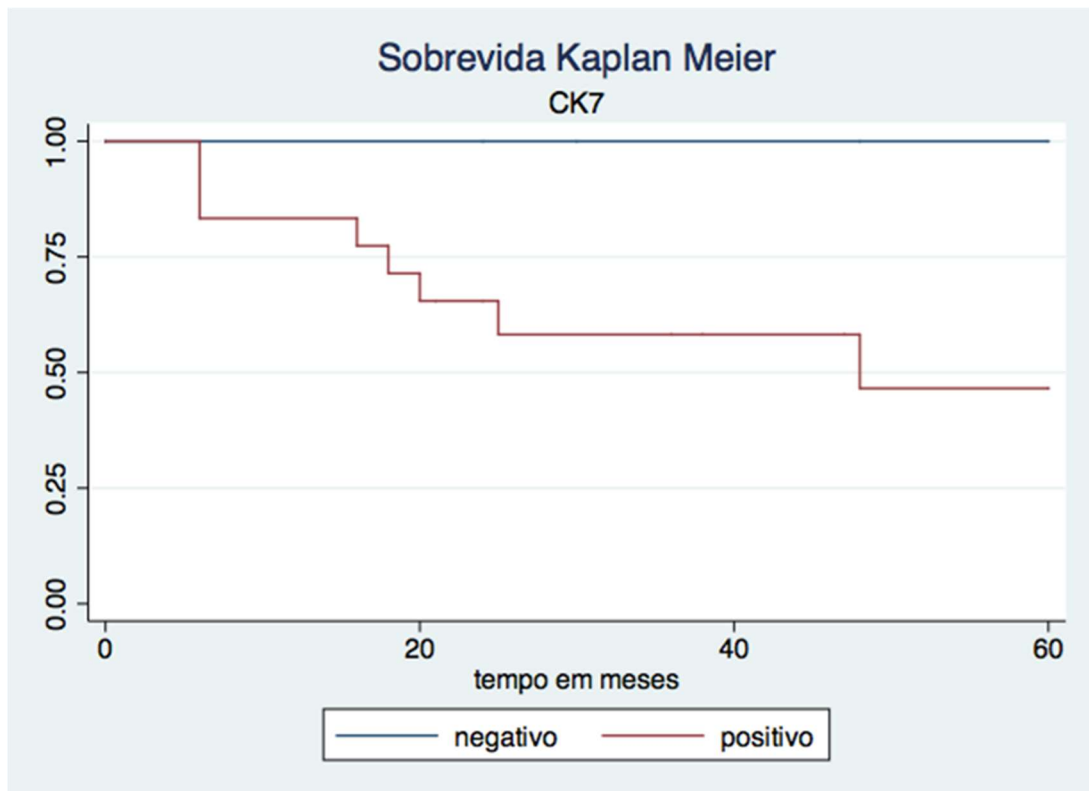


Figura 20: Curva de Kaplan-Meier da sobrevida dos 26 pacientes com adenocarcinoma da ampola de Vater segundo a expressão da citoqueratina CK7. Teste de igualdade de curvas: Logrank ($p=0,134$), Wilcoxon ($p=0,068$), Tarone Ware ($p=0,080$).

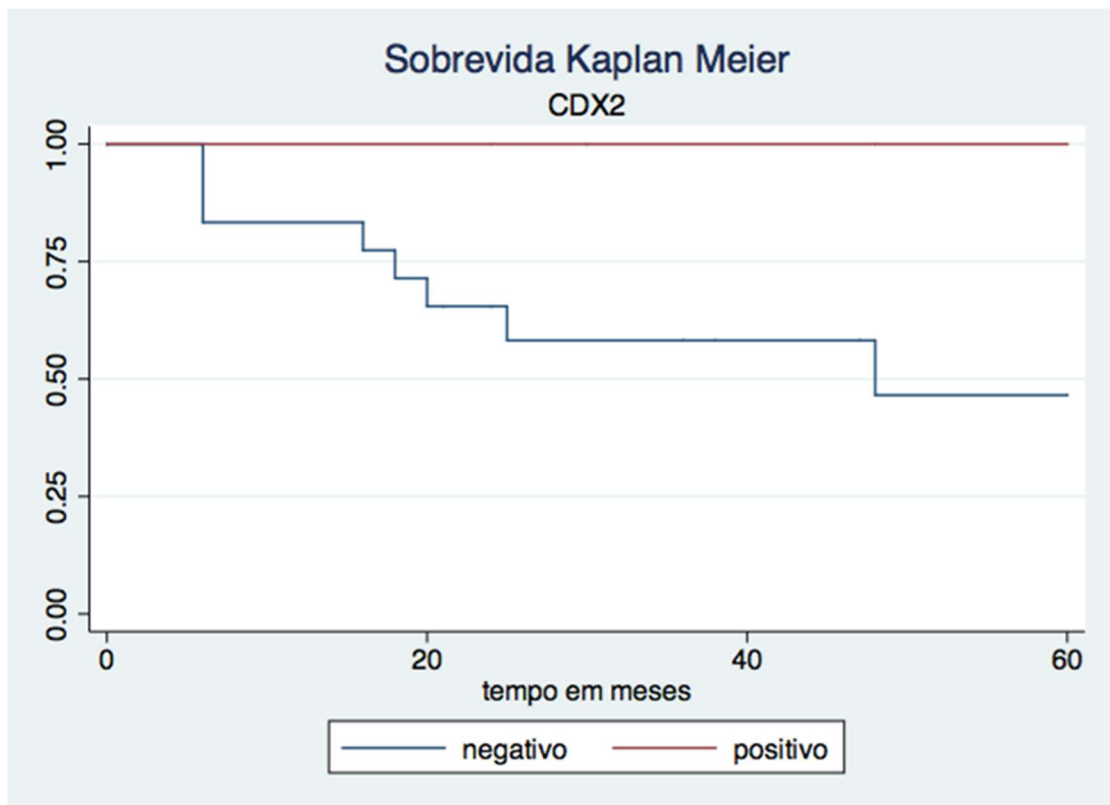


Figura 21: Curva de Kaplan-Meier da sobrevivência dos 26 pacientes com adenocarcinoma da ampola de Vater segundo a expressão do fator de transcrição CDX2. Teste de igualdade de curvas: Logrank ($p=0,134$), Wilcoxon ($p=0,068$), Tarone Ware ($p=0,080$).

5. DISCUSSÃO

5.1 DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS

Os dados etários revelaram uma homogeneidade da amostra. A mediana de idade de 62 anos, encontrada em nosso estudo, é condizente com aquelas encontradas em outros estudos da literatura,^{1; 49} assim como a mediana de idade maior dos pacientes acometidos pelos tumores do tipo intestinal (72 anos) em comparação àquela do tipo pancreatobiliar (62 anos). Também, assim como na literatura, observamos um aumento da incidência dos tumores da ampola com o avanço da idade.

Ao contrário de outras casuísticas^{1; 16; 22; 23; 33; 37; 49}, incluindo entre elas o maior trabalho populacional já realizado de Albores-Saavedra *et al.* em 2009, nos Estados Unidos, as mulheres representaram a maior parcela de acometidos em nosso estudo, representando 66,7% da amostra.

Não houve diferença na prevalência entre negros e caucasianos nos maiores trabalhos populacionais sobre o assunto.^{1; 49} Devido à alta taxa de miscigenação na população brasileira, este parâmetro não foi avaliado em nossa amostra.

O tabagismo e o etilismo não estiveram presentes na maior parte dos nossos pacientes. Como esses fatores estão, sabidamente, relacionados ao desenvolvimento de neoplasias malignas e, na presente amostra, eles estiveram presentes em poucos pacientes, nossa casuística mostra ser adequada para o estudo de outros fatores de riscos não relacionados ao tabagismo e etilismo.

Pelo fato da parcela de idosos ter representado 63,3% dos pacientes, e a média e a mediana das idades ficarem acima dos 60 anos, era de se esperar que grande parte dos nossos doentes apresentassem comorbidades já diagnosticadas no período pré-operatório. Esta expectativa confirmou-se em 19 dos 30 pacientes.

A dosagem sérica de CEA e CA 19.9 foram variáveis que tiveram perdas, por ausência de registros nos prontuários médicos, principalmente, nos anos iniciais da coleta de dados, quando ainda não havia protocolos específicos para a dosagem de marcadores tumorais. Dessa forma, a análise destas variáveis foi prejudicada.

O alto percentual de história familiar positiva para neoplasia maligna, nos chamou a atenção, assim como, a história de outras neoplasias associadas, que estiveram presentes em quatro pacientes. Apesar destes achados não terem tido associação com os tipos histológicos, nos permitiram inferir sobre o componente hereditário ligado a estas neoplasias. Entretanto, estudos pormenorizados necessitam ser realizados para melhor caracterização dessa hipótese. Na revisão da literatura, não encontramos menção a este aspecto em nenhuma publicação.

Amostras pequenas, comuns quando se estuda um agravo raro como o tumor da ampola de Vater, podem gerar grupos heterogêneos. Para evitar ou reduzir os fatores de confusão na amostra, contou-se com um grupo homogêneo de pacientes. A análise descritiva das variáveis contou com medidas de tendência central, dispersão e amplitude para as variáveis contínuas, e distribuição de frequências absolutas e relativas para as categóricas. Nós utilizamos o método estatístico de análise de agrupamentos semelhantes (*cluster*) para definir os tipos histológicos baseados nos grupos obtidos a partir dos dados da imuno-histoquímica. Este método foi capaz de definir os dois tipos histológicos de acordo com o poder de discernimento de cada marcador. Vale ressaltar que, através deste método, pode-se atribuir quantos agrupamentos forem adequados, baseando-se exclusivamente na semelhança dos dados coletados para a análise. Assim, podíamos encontrar outro número de grupos, diferente de dois, se assim entendesse o método ou assim sugerisse nossos dados. A ferramenta estatística serviu para validar o resultado da classificação feita pelo patologista, baseada na avaliação pela HE associada à análise do painel imuno-histoquímico, uma vez que a concordância foi de 100% entre os métodos.

5.2 TRATAMENTO CIRÚRGICO

A ressecção deve ser sempre com margens livres de tumor (R0), compreendendo a duodenopancreatectomia cefálica, com ou sem preservação pilórica, associada a linfadenectomia regional.^{50; 51; 52}

Ao contrário do que se encontra na publicação de Winter *et al.*, na qual enfatizam que a preservação pilórica não deve ser realizada somente quando se implica em comprometimento da margem de ressecção tumoral,²² a gastroduodenopancreatectomia cefálica, sem a preservação pilórica, foi o procedimento

mais realizado em nosso serviço, independentemente da análise da margem de ressecção. A linfadenectomia regional, como prega a literatura, foi sempre realizada. A reconstrução do trânsito pancreatobiliar e gastrojejunal realizada em nosso serviço é em alça única, com anastomose pancreatojejunal ducto-mucosa. Os quatro casos de preservação pilórica da nossa casuística foram realizados nos dois últimos anos deste estudo e é, hoje em dia, utilizado com maior frequência, como enfatizado por Winter *et al.*

A ampulectomia endoscópica é defendida por alguns autores nos casos de adenomas, sendo inadequada para os adenocarcinomas, mesmo nos tumores com estadiamentos T1 e T2, tendo em vista a alta prevalência de acometimento linfonodal nos casos de tumores da ampola de Vater, em especial nos tumores do tipo mais comum, o pancreatobiliar.^{19; 20; 21} Nossos achados ratificam este último aspecto.

O único caso de ampulectomia da nossa casuística, realizado por via laparotômica, foi indicado por tratar-se de um adenoma previamente diagnosticado por biópsia endoscópica. Apesar do exame de congelação ter sido negativo, o exame histopatológico final em parafina mostrou tratar-se de um adenocarcinoma invasor. Essa paciente, entretanto, recusou o tratamento cirúrgico complementar pela gastroduodenopancreatectomia. Mesmo assim, de forma surpreendente, a paciente não apresentou recidiva tumoral nos cinco anos de acompanhamento. O tumor era do tipo intestinal.

5.3 QUIMIOTERAPIA ADJUVANTE

No presente estudo, optou-se pela não avaliação da quimioterapia adjuvante devido à inexistência de protocolos bem sedimentados. A maioria de nossos pacientes recebeu quimioterapia somente após recidiva da neoplasia, o que impossibilitou a avaliação desta variável. Sabe-se que o papel deste tratamento ainda não é bem definido na literatura, nem quanto ao grupo de pacientes que se beneficiaria dele, nem mesmo quanto ao esquema de fármacos que deveria ser utilizado.^{24; 53; 54; 55; 56}

Krishnan *et al.*, em 2008,⁵³ observaram benefício da quimioterapia apenas entre os pacientes com tumores de papila em estádios T3 e T4 e não para aqueles com acometimento linfonodal (N1), como seria esperado em analogia ao tratamento de

outras neoplasias do aparelho digestivo. Neoptolemos *et al.*, em 2012,⁵⁴ em estudo randomizado, controlado e multicêntrico do Grupo de Estudo Europeu de Câncer Pancreático (ESPAC-3 *perampullary trial*) também defendem a quimioterapia adjuvante, porém indicando-a a todos os pacientes com TAV, independentemente do tipo histológico. Já Zhou *et al.*, 2009,⁵⁵ em um estudo com 111 pacientes e Klinkenbijn *et al.*, 1999,⁵⁶ em outro estudo, este randomizado, controlado e multicêntrico, com 92 pacientes, ambos não observaram qualquer benefício da quimioterapia adjuvante na sobrevida dos pacientes com TAV.

5.4 TIPO HISTOLÓGICO

O tipo pancreatobiliar foi responsável pela maior parcela dos nossos casos, em conformidade com a maioria das publicações.^{2; 14; 25; 29; 30; 32; 35; 38; 42; 57} Porém, diferentemente, Albores-Saavedra, Westgaard, Carter, Ruemmele, Lee e outros^{6; 8; 23; 31; 37; 58} encontraram uma maior parcela de tumores do tipo intestinal em suas amostras como podemos observar na **Figura 22**.

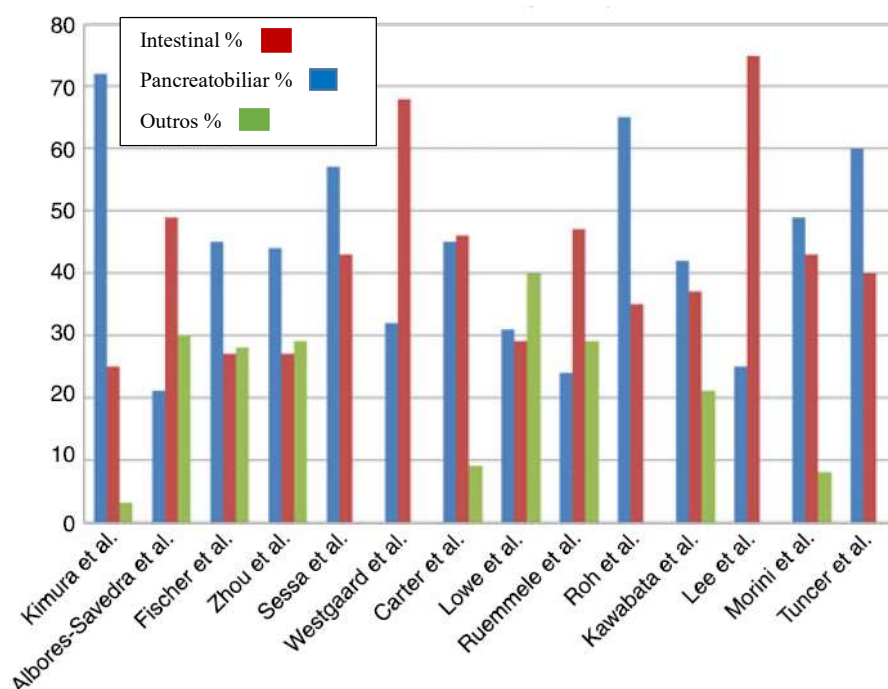


Figura 22: Taxas de incidência dos tipos histológicos intestinal e pancreatobiliar reportadas na literatura.

Fonte: Extraída e adaptada de Perysinakis *et al.*, 2014.

O tipo intestinal associou-se em nosso estudo com os TAV de estadiamentos e prognósticos melhores. Este tipo histológico acometeu mais os pacientes com idade avançada e apresentou-se, caracteristicamente, em graus de invasão tumoral mais precoces, sem acometimento linfonodal e sem invasão angiolinfática e perineural. As medidas de sobrevida dos pacientes com tumores do tipo intestinal foram muito mais favoráveis do que as medidas de sobrevida dos pacientes com tumores do tipo pancreatobiliar. Este, por sua vez, acometeu pacientes mais jovens e apresentou-se, caracteristicamente, em graus de invasão tumoral mais avançados, com presença de acometimento linfonodal e de invasão angiolinfática e perineural, os quais lhe conferiram estadiamentos e prognósticos menos favoráveis. Este comportamento biológico distinto entre os tipos histológicos dos TAV e mais agressivo no tipo pancreatobiliar, encontrado em nosso estudo, é consagrado de forma unânime pela literatura.^{8; 18; 22; 25; 30; 31; 33; 37; 57; 58}

5.5 ACURÁCIA DOS MARCADORES IMUNO-HISTOQUÍMICOS

Apesar de se observar uma certa variabilidade na acurácia dos imunomarcadores nas diversas publicações, há evidências de que alguns deles se destacam mais do que outros como bons discriminadores do tipo histológico dos TAV.

No presente estudo, os imunomarcadores que se revelaram mais importantes foram a citoqueratina CK7 e o fator de transcrição CDX2. Estes foram os marcadores que apresentaram maior capacidade de separar os tumores da ampola de Vater em tipo intestinal e tipo pancreatobiliar. CK7, MUC1 e MUC5AC, em ordem decrescente de importância, relacionaram-se ao tipo pancreatobiliar; enquanto CDX2, CK20 e MUC2, em ordem decrescente de importância, relacionaram-se ao tipo intestinal. EpCAM não revelou ser capaz de discriminar os tipos histológicos, uma vez que foi expressa em quase a totalidade dos tumores de ambos os tipos.

De Paiva Haddad *et al.*, em 2010, publicaram o único trabalho sobre o assunto no Brasil. Estes autores estudaram os marcadores MUC1, MUC2, MUC5AC, MUC6, CDX2, CK7, CK17, CK20, e CD10 em 97 tumores da ampola de Vater. Em concordância com os nossos achados, MUC1 e CK7 foram altamente relacionadas ao tipo pancreatobiliar e MUC2, CDX2 e CK20 ao tipo intestinal. Os marcadores CDX2, MUC1 e MUC2 foram os que apresentaram maior acurácia, com destaque para o CDX2

que se destacou dos demais imunomarcadores, com sensibilidade de 86% e especificidade de 78,7% para os tumores do tipo intestinal. Nossos resultados, diferentemente, não demonstraram a mesma importância dada por estes autores às mucinas, as quais revelaram ser menos importantes do que as citoqueratinas e o fator de transcrição nuclear na nossa avaliação. Também de forma divergente do que encontramos, De Paiva Haddad *et al.* observaram CK7 positiva em 79,1% dos tumores tipo intestinal e em 93,6% dos pancreatobiliares, atribuindo-lhe uma especificidade de apenas 20,9% e, conseqüentemente, pouca importância para discriminar os tipos histológicos.^{30; 59}

Kawabata *et al.*, em 2010, em concordância com os nossos achados, também relacionaram os marcadores CK20 aos tumores do tipo intestinal e MUC1 aos tumores do tipo pancreatobiliar. Nesse trabalho, os tumores que possuíam a expressão de CK20 apresentaram melhor prognóstico.³⁸ Esta citoqueratina não foi fator prognóstico significativo em nosso estudo.

Sessa *et al.*, em 2007, estudaram a expressão de MUC1, MUC2, MUC5AC, MUC6 e CDX2 para classificarem 53 TAV. CDX2, mais uma vez, relacionou-se aos tumores do tipo intestinal, enquanto MUC1 e MUC5AC aos tumores do tipo pancreatobiliar. Ainda em consonância com nosso estudo, CDX2 foi também o marcador com a maior acurácia para diferenciar o tipo intestinal.³²

Nossos resultados foram corroborados pelo estudo de Chu *et al.*, em 2005, que utilizaram a imuno-histoquímica para estudar os TAV. Os melhores imunomarcadores para estes autores foram o CDX2 e a CK7. O CDX2 apresentou uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 83,3% para o tipo intestinal, enquanto o CK7 teve sensibilidade de 83,3% e uma especificidade de 81,8% para o tipo pancreatobiliar nesse estudo.⁶⁰

EpCAM não havia sido estudada por nenhum outro trabalho como possível marcador dos tipos histológicos do TAV ou como fator prognóstico. Nossos resultados não conseguiram demonstrar utilidade deste marcador para estes fins.

A diferença no percentual de expressão de alguns imunomarcadores entre os nossos resultados e outros encontrados na literatura talvez possa ser explicada pela diferença metodológica quanto à obtenção dos cortes a serem estudados pela imuno-histoquímica. A nossa pesquisa é praticamente única ao se utilizar o corte completo do bloco de parafina para a realização da imuno-histoquímica, ao invés de se empregar o

tissue array, no qual retira-se apenas uma pequena área do tumor. A grande vantagem do nosso método é a de permitir que uma área extensa do tumor seja examinada, além de ter-se o controle interno das reações, pela marcação ou não dos tecidos adjacentes. A marcação imuno-histoquímica dessas estruturas adjacentes é amplamente reconhecida na literatura, e torna os resultados mais fidedignos. Já no método *tissue array*, não se sabe ao certo se, num caso de um tumor de imunomarcção heterogênea, foi adquirido um pequeno corte a ser estudado onde podem estar ausentes alguns dos imunomarcadores deste tumor, gerando um resultado falso-negativo, impactando a sensibilidade da avaliação imuno-histoquímica. Além disso, perde-se a possibilidade do controle interno, na própria lâmina, das reações imunoenzimáticas, o que reduz o controle de qualidade dos exames e, conseqüentemente a confiabilidade dos resultados.

Durante nossa análise percebemos que a marcação de alguns imunomarcadores era heterogênea em diferentes áreas do tumor. Este fato pode ser explicado por publicações atuais que descrevem os aspectos mistos de tumores que tem origem a partir de lesões polipoides precursoras descritas por Ohike *et al.*, em 2010, definidas como IAPN (*Intra-ampullary Papillary-tubular Neoplasm*).¹³ Todavia, não foi objetivo do presente trabalho explorar essas particularidades. Assim, como recomendado pelos autores, consideramos positivos somente os casos em que a marcação foi expressiva em mais de 10% do tumor.^{6; 32; 36; 38} Dessa forma, acreditamos ter-se obtido o fenótipo predominante. Estudos futuros poderão ser realizados para melhor caracterização dos tumores mistos que possam existir em nossa amostra.

5.6 ÍNDICE DE CONCORDÂNCIA: HISTOLOGIA VERSUS IMUNO-HISTOQUÍMICA

A avaliação histológica convencional pela HE, na grande maioria das publicações, é utilizada como parâmetro para o cálculo da especificidade e sensibilidade dos testes realizados pela imuno-histoquímica. Não foi objetivo do presente estudo determinar a acurácia dos imunomarcadores em relação à classificação pelo HE.

Em nosso estudo, para determinar quais marcadores poderiam melhor discriminar os tipos histológicos, optou-se pelo método de análise multivariada denominado "análise de *cluster* " ou de agrupamentos semelhantes que mostrou um

índice de concordância de 100% com a análise imuno-histoquímica. Isto significa que o método alocou os tumores em dois grupos de acordo com a expressão de imunomarcadores que lhes conferiram características internas semelhantes. Destaca-se que, para essa análise, o número de grupos a serem obtidos não foi previamente estipulado. Ao se avaliar o resultado da análise de agrupamentos (*cluster*), foi possível identificar-se os dois grupos obtidos como pancreatobiliar (grupo ou *cluster* 1) e intestinal (grupo ou *cluster* 2), tendo como base toda a literatura referente aos imunofenótipos. A estatística demonstrou o poder de discernimento de cada imunomarcador para definir a alocação entre os dois grupos. Foi dessa forma que CK7 e CDX2 foram identificados como os imunomarcadores com maior poder de discernimento entre os dois grupos.

Kumari *et al.*, em 2013, estudaram o papel da imuno-histoquímica na classificação dos tumores da ampola de Vater. Os imunomarcadores estudados foram MUC1, MUC2, CK7, CK20, CK17 e CDX2. A concordância entre o exame histológico convencional (HE) e o exame imuno-histoquímico foi alta ($k = 0,94$). A imuno-histoquímica auxiliou na diferenciação de quatro casos de tumores mistos ou classificados como de outros tipos (células em anel de sinete e adenoescamoso). Segundo eles, a imuno-histoquímica só deveria ser usada em casos morfológicamente difíceis e não rotineiramente, para todos os casos.³⁵

No estudo brasileiro de De Paiva Haddad *et al.*, o índice de concordância encontrada entre o exame histológico convencional (HE) e o estudo imuno-histoquímico também foi alto ($k = 0,70$).^{30; 59}

Está claro na literatura que a imuno-histoquímica é capaz de auxiliar os patologistas na diferenciação dos tipos de adenocarcinomas ampulares em tipo intestinal e pancreatobiliar, assim como é capaz de diferenciar os diversos tumores periampulares entre si.^{8; 23; 30; 35; 37; 40; 57; 58} No entanto, é importante salientar que, apesar deste poder de diferenciação da imuno-histoquímica, o exame histológico convencional (HE) interpretado por patologistas experientes tem se mostrado ser tão eficaz quanto o exame imuno-histoquímico na diferenciação dos tipos histológicos, tendo em vista a alta concordância entre os métodos apresentados em publicações prévias.^{23; 30; 35}

Acredita-se que a contribuição do presente estudo, e de outros com o mesmo enfoque, esteja em identificar entre os múltiplos marcadores imuno-histoquímicos disponíveis, aqueles que melhor cumprem o papel de discriminar os tumores, em busca

de um painel efetivo e com o menor custo possível. Dessa forma, o diagnóstico correto quanto ao tipo histológico poderia dispensar a realização de um painel imuno-histoquímico envolvendo vários marcadores, tornando o processo mais exequível. Nosso estudo cumpriu este papel ao mostrar que o fator de transcrição CDX2 esteve fortemente relacionado ao tipo histológico intestinal, e a citoqueratina CK7, ao tipo histológico pancreatobiliar, e que ambos possuem forte poder de discriminação dos tipos histológicos dos TAV. Sugerimos, baseados em nosso estudo, que a imuno-histoquímica seja utilizada de forma racional, para diferenciar casos de classificação difícil pela histologia convencional e utilizando-se apenas dos marcadores mais eficazes, dentre eles a CK7 e o CDX2.

5.7 SOBREVIDA E FATORES PROGNÓSTICOS

Na análise univariada da sobrevida, a citoqueratina CK7 e o fator de transcrição CDX2 foram marcadores de pior e melhor prognóstico, respectivamente ($p < 0,10$). Nenhum outro marcador imuno-histoquímico revelou-se como fator prognóstico.

Schiorgens *et al.*, em 2015,²³ também associaram a CK7 ($p = 0,02$) como fator de mau prognóstico (HR=1,86; IC95% 1,05-3,28). Neste estudo, a pior sobrevida foi observada nos tumores pancreatobiliares CK7+ (HR=3,37). Morini *et al.*, em 2013,⁵⁷ identificaram apenas a CK20 como fator prognóstico independente ($p = 0,04$). A CK7 foi relacionada a mau prognóstico apenas na análise univariada, e quando associada a ausência de expressão da CK20. Já Hansel *et al.*, em 2005,⁶¹ estudaram a expressão do fator CDX2 em 53 tumores da ampola de Vater e a relação deste com a sobrevida. Assim como em nosso estudo, este marcador associou-se aos tumores do tipo intestinal e revelou-se fator de bom prognóstico.

Além do imunofenótipo, outros fatores que impactaram negativamente na sobrevida dos nossos pacientes foram o grau de invasão dos tumores (T), o acometimento neoplásico linfonodal (N1) e a invasão angiolinfática e perineural ($p < 0,05$). Bronsert *et al.*, Albores-Saavedra *et al.*, Kim *et al.*, Morini *et al.*, Colussi *et al.*, Showalter *et al.*, Roggin *et al.*, De Paiva Haddad *et al.*, Hatzaras *et al.*, Winter *et al.*, Berberat *et al.*, dentre outros, são autores que corroboram esses achados.^{1; 8; 16; 19; 22; 24; 26; 29; 30; 57}

Idade inferior a 50 anos também foi fator de mau prognóstico em nossos doentes. Todos os pacientes desta faixa etária apresentavam tumores do tipo pancreatobiliar. Em nossa casuística, a paciente mais jovem tinha 30 anos e um tumor do tipo pancreatobiliar T4N1M0 (estádio III). Sua sobrevida foi de apenas 6 meses. Showalter *et al.*, em 2011;²⁴ e Colussi *et al.*, em 2015,²⁹ foram aqueles que observaram a idade como fator de mau prognóstico em análises multivariadas. Porém, inversamente ao que achamos, nestes estudos o risco aumentava nos pacientes mais idosos (>75 anos).

Na análise multivariada dos fatores prognósticos, nenhum imunomarcador impactou significativamente a curva de sobrevida, como encontramos em outros trabalhos da literatura^{8; 30; 58}. A classificação histológica dos tumores também não teve impacto significativo na sobrevida nesta análise ($p=0,096$). Pode ser que o pequeno número de pacientes alocados para cada classificação tenha sido insuficiente para a obtenção de resultados semelhantes ao de outras publicações que mostraram a pior sobrevida nos tumores do tipo pancreatobiliar com significância estatística.^{8; 25; 31; 57}

O único fator prognóstico independente com significância estatística que encontramos, em meio às diversas variáveis clinicopatológicas estudadas, foi o acometimento neoplásico linfonodal (HR=9,03, $p=0,009$). Este resultado é bem ilustrado pela mediana de sobrevida encontrada entre os pacientes N1. A presença de linfonodos acometidos praticamente abreviou pela metade a sobrevida dos indivíduos. Vale salientar ainda que todos os pacientes que tinham acometimento linfonodal tinham tumores do tipo pancreatobiliar. Nenhum tumor do tipo intestinal invadiu linfonodos.

5.8 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS

Este estudo tratou de uma afecção rara e, por isso, foi limitado pelo número pequeno de pacientes. Por outro lado, ampliou o seu mérito por ser experiência de uma única instituição, o que diminuiu os vieses de diferentes condutas.

Outra limitação está relacionada à coleta retrospectiva para uma época do estudo, de 2003 a 2011, que fez com que perdêssemos alguns dados. Além de dados relacionados às variáveis de interesse, três blocos de parafina contendo amostras de tumores deste período não foram mais encontrados, reduzindo ainda mais nossa casuística.

Este estudo abriu perspectivas para novas pesquisas que possam melhor entender a patogênese dos tumores da ampola de Vater. Além de que, baseado no estudo imuno-histoquímico, questões relacionadas à indicação de quimioterapia adjuvante também poderão ser respondidas, sobretudo, em relação aos casos de tumores do tipo pancreatobiliar.

Acredita-se que um outro parâmetro que pode ainda ser melhor explorado, em relação à utilização da imuno-histoquímica, seja a indicação da ressecção endoscópica. Pelos nossos resultados os tumores pancreatobiliares tiveram pior estadiamento, maior acometimento linfonodal, mais invasão angiolinfática e perineural e, portanto, mesmo em estágios iniciais, talvez, não devessem ser submetidos à ressecção endoscópica. Por outro lado, aqueles do tipo intestinal talvez pudessem ter maior abordagem por esta via. Esta é uma dúvida que poderá ser respondida em pesquisas futuras.

A molécula de adesão epitelial EpCAM também merece maiores estudos nestes tumores. Por um lado, vimos que a sua expressão não se presta a discriminar os tipos histológicos, já que se revelou presente em quase a totalidade dos casos em nosso estudo, por outro lado, essa expressão quase universal pode abrir espaço para terapias alvo-específicas eficazes no tratamento desta doença, abrindo um novo panorama no seu tratamento quimioterápico.

6. CONCLUSÃO

– Os adenocarcinomas da ampola de Vater foram classificados em dois tipos, intestinal e pancreatobiliar, através da expressão dos marcadores imunohistoquímicos MUC1, MUC5AC e CK7, os quais relacionaram-se ao tipo pancreatobiliar, e MUC2, CDX2 e CK20, os quais relacionaram-se ao tipo intestinal. EpCAM expressou-se em ambos os tipos histológicos, não servindo, dessa maneira, para discriminar os tumores.

– Os imunomarcadores que melhor discriminaram os dois tipos histológicos dos tumores da ampola de Vater foram a citoqueratina CK7, para o tipo pancreatobiliar, e o fator de transcrição CDX2, para o tipo intestinal.

– As variáveis clinicopatológicas que estiveram associadas aos tipos histológicos dos tumores, na análise univariada, foram a idade, o acometimento neoplásico linfonodal, a invasão angiolinfática e perineural e o estadiamento da doença. Na análise multivariada, a única variável clinicopatológica identificada foi a invasão angiolinfática, fortemente associada aos tumores do tipo pancreatobiliar.

– As variáveis clinicopatológicas que estiveram associadas significativamente ($p < 0,05$) à menor sobrevida dos pacientes, na análise univariada, foram a idade, o grau de invasão tumoral, o acometimento neoplásico linfonodal, o estadiamento da doença e a invasão angiolinfática e perineural. Na análise multivariada, o único fator prognóstico independente que teve impacto negativo na sobrevida foi o acometimento linfonodal.

7. REFERÊNCIAS

- ¹ ALBORES-SAAVEDRA, J. et al. Cancers of the ampulla of Vater: demographics, morphology, and survival based on 5,625 cases from the SEER program. **J Surg Oncol**, v. 100, n. 7, p. 598-605, Dec 1 2009. ISSN 0022-4790.
- ² FISCHER, H. P.; ZHOU, H. Pathogenesis of carcinoma of the papilla of Vater. **J Hepatobiliary Pancreat Surg**, v. 11, n. 5, p. 301-9, 2004. ISSN 0944-1166 (Print) 0944-1166.
- ³ GARDNER, E.; GRAY, D. J.; O'RAHILLY, R. **Anatomia: estudo regional do copo humano**. 4. Rio de Janeiro, RJ: 1988. 815
- ⁴ KIMURA, W. et al. Different clinicopathologic findings in two histologic types of carcinoma of papilla of Vater. **Jpn J Cancer Res**, v. 85, n. 2, p. 161-6, Feb 1994. ISSN 0910-5050 (Print) 0910-5050.
- ⁵ ALBORES-SAAVEDRA, J.; HENSON, D. E.; KLIMSTRA, D. S. **Tumors of the gallbladder, extrahepatic bile ducts, and ampulla of Vater**. Washington, D.C.: Armed Forces Institute of Pathology, 2000. ISBN 1881041581 (pbk.).
- ⁶ WESTGAARD, A. et al. Pancreatobiliary versus intestinal histologic type of differentiation is an independent prognostic factor in resected periampullary adenocarcinoma. **BMC Cancer**, v. 8, p. 170, 2008. ISSN 1471-2407.
- ⁷ SCHIRMACHER, P.; BUCHLER, M. W. Ampullary adenocarcinoma - differentiation matters. In: (Ed.). **BMC Cancer**. England, v.8, 2008. p.251. ISBN 1471-2407 (Electronic) 1471-2407 (Linking).
- ⁸ BRONSERT, P. et al. Intestinal-type of differentiation predicts favourable overall survival: confirmatory clinicopathological analysis of 198 periampullary adenocarcinomas of pancreatic, biliary, ampullary and duodenal origin. **BMC Cancer**, v. 13, p. 428, 2013. ISSN 1471-2407.
- ⁹ KIMURA, W.; FUTAKAWA, N.; ZHAO, B. Neoplastic diseases of the papilla of Vater. **J Hepatobiliary Pancreat Surg**, v. 11, n. 4, p. 223-31, 2004. ISSN 0944-1166 (Print) 0944-1166.

- 10 RESENDE, V. et al. Papillary neoplasias of the biliary tract. **Rev Col Bras Cir**, v. 41, n. 6, p. 445-50, Nov-Dec 2014. ISSN 0100-6991.
- 11 PARK, S. et al. Expression of E-cadherin and beta-catenin in the adenoma-carcinoma sequence of ampulla of Vater cancer. **Hepatogastroenterology**, v. 53, n. 67, p. 28-32, Jan-Feb 2006. ISSN 0172-6390 (Print)
0172-6390.
- 12 TAKASHIMA, M. et al. Carcinoma of the ampulla of Vater associated with or without adenoma: a clinicopathologic analysis of 198 cases with reference to p53 and Ki-67 immunohistochemical expressions. **Mod Pathol**, v. 13, n. 12, p. 1300-7, Dec 2000. ISSN 0893-3952 (Print)
0893-3952.
- 13 OHIKE, N. et al. Intra-ampullary papillary-tubular neoplasm (IAPN): characterization of tumoral intraepithelial neoplasia occurring within the ampulla: a clinicopathologic analysis of 82 cases. **Am J Surg Pathol**, v. 34, n. 12, p. 1731-48, Dec 2010. ISSN 0147-5185.
- 14 ROH, Y. H. et al. The clinicopathologic and immunohistochemical characteristics of ampulla of Vater carcinoma: the intestinal type is associated with a better prognosis. **Hepatogastroenterology**, v. 54, n. 78, p. 1641-4, Sep 2007. ISSN 0172-6390 (Print)
0172-6390.
- 15 JEAN, M.; DUA, K. Tumors of the ampulla of Vater. **Curr Gastroenterol Rep**, v. 5, n. 2, p. 171-5, Apr 2003. ISSN 1522-8037 (Print)
1522-8037.
- 16 HATZARAS, I. et al. Predictors of survival in periampullary cancers following pancreaticoduodenectomy. **Ann Surg Oncol**, v. 17, n. 4, p. 991-7, Apr 2010. ISSN 1068-9265.
- 17 PERYSINAKIS, I.; MARGARIS, I.; KOURAKLIS, G. Ampullary cancer--a separate clinical entity? **Histopathology**, v. 64, n. 6, p. 759-68, May 2014. ISSN 0309-0167.
- 18 QIAO, Q. L. et al. Carcinoma of the ampulla of Vater: factors influencing long-term survival of 127 patients with resection. **World J Surg**, v. 31, n. 1, p. 137-43; discussion 144-6, Jan 2007. ISSN 0364-2313 (Print)
0364-2313.
- 19 ROGGIN, K. K. et al. Limitations of ampullectomy in the treatment of nonfamilial ampullary neoplasms. **Ann Surg Oncol**, v. 12, n. 12, p. 971-80, Dec 2005. ISSN 1068-9265 (Print)
1068-9265.

- 20 MOON, J. H.; CHOI, H. J.; LEE, Y. N. Current status of endoscopic papillectomy for ampullary tumors. **Gut Liver**, v. 8, n. 6, p. 598-604, Nov 2014. ISSN 1976-2283.
- 21 NAPOLEON, B. et al. Endoscopic papillectomy for early ampullary tumors: long-term results from a large multicenter prospective study. **Endoscopy**, v. 46, n. 2, p. 127-34, Feb 2014. ISSN 0013-726x.
- 22 WINTER, J. M. et al. Clinicopathologic analysis of ampullary neoplasms in 450 patients: implications for surgical strategy and long-term prognosis. **J Gastrointest Surg**, v. 14, n. 2, p. 379-87, Feb 2010. ISSN 1091-255x.
- 23 SCHIERGENS, T. S. et al. Histomorphologic and molecular phenotypes predict gemcitabine response and overall survival in adenocarcinoma of the ampulla of Vater. **Surgery**, v. 158, n. 1, p. 151-61, Jul 2015. ISSN 0039-6060.
- 24 SHOWALTER, T. N. et al. The influence of prognostic factors and adjuvant chemoradiation on survival after pancreaticoduodenectomy for ampullary carcinoma. **J Gastrointest Surg**, v. 15, n. 8, p. 1411-6, Aug 2011. ISSN 1091-255x.
- 25 KIM, W. S. et al. Clinical significance of pathologic subtype in curatively resected ampulla of vater cancer. **J Surg Oncol**, v. 105, n. 3, p. 266-72, Mar 2012. ISSN 0022-4790.
- 26 BERBERAT, P. O. et al. An audit of outcomes of a series of periampullary carcinomas. **Eur J Surg Oncol**, v. 35, n. 2, p. 187-91, Feb 2009. ISSN 0748-7983.
- 27 SOBIN, L. H.; GOSPODAROWICZ, M. K.; WITTEKIND, C. **TNM classification of malignant tumours**. 7th ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010. ISBN 9781444332414 (pbk.) : 132.50
- 28 COMPTON, C. C.; AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER. **AJCC cancer staging atlas a companion to the seventh editions of the AJCC cancer staging manual and handbook**. New York: Springer, 2012.
- 29 COLUSSI, O. et al. Prognostic score for recurrence after Whipple's pancreaticoduodenectomy for ampullary carcinomas; results of an AGEO retrospective multicenter cohort. **Eur J Surg Oncol**, v. 41, n. 4, p. 520-6, Apr 2015. ISSN 0748-7983.
- 30 DE PAIVA HADDAD, L. B. et al. Lymph node involvement and not the histopathologic subtype is correlated with outcome after resection of adenocarcinoma of the ampulla of vater. **J Gastrointest Surg**, v. 14, n. 4, p. 719-28, Apr 2010. ISSN 1091-255x.

- 31 CARTER, J. T. et al. Tumors of the ampulla of vater: histopathologic classification and predictors of survival. **J Am Coll Surg**, v. 207, n. 2, p. 210-8, Aug 2008. ISSN 1072-7515.
- 32 SESSA, F. et al. Prognostic factors for ampullary adenocarcinomas: tumor stage, tumor histology, tumor location, immunohistochemistry and microsatellite instability. **Virchows Arch**, v. 451, n. 3, p. 649-57, Sep 2007. ISSN 0945-6317 (Print) 0945-6317.
- 33 ADSAY, V. et al. Ampullary region carcinomas: definition and site specific classification with delineation of four clinicopathologically and prognostically distinct subsets in an analysis of 249 cases. **Am J Surg Pathol**, v. 36, n. 11, p. 1592-608, Nov 2012. ISSN 0147-5185.
- 34 YONEZAWA, S. et al. Expression profiles of MUC1, MUC2, and MUC4 mucins in human neoplasms and their relationship with biological behavior. **Proteomics**, v. 8, n. 16, p. 3329-41, Aug 2008. ISSN 1615-9853.
- 35 KUMARI, N. et al. Intestinal and pancreatobiliary differentiation in periampullary carcinoma: the role of immunohistochemistry. **Hum Pathol**, v. 44, n. 10, p. 2213-9, Oct 2013. ISSN 0046-8177.
- 36 ANG, D. C. et al. The utility of immunohistochemistry in subtyping adenocarcinoma of the ampulla of vater. **Am J Surg Pathol**, v. 38, n. 10, p. 1371-9, Oct 2014. ISSN 0147-5185.
- 37 CHANG, D. K. et al. Histomolecular phenotypes and outcome in adenocarcinoma of the ampulla of vater. **J Clin Oncol**, v. 31, n. 10, p. 1348-56, Apr 1 2013. ISSN 0732-183x.
- 38 KAWABATA, Y. et al. Cytokeratin 20 (CK20) and apomucin 1 (MUC1) expression in ampullary carcinoma: Correlation with tumor progression and prognosis. **Diagn Pathol**, v. 5, p. 75, 2010. ISSN 1746-1596.
- 39 MORIYA, T. et al. Expression of MUC1 and MUC2 in ampullary cancer. **Int J Surg Pathol**, v. 19, n. 4, p. 441-7, Aug 2011. ISSN 1066-8969.
- 40 SCHUENEMAN, A. et al. Validation of histomolecular classification utilizing histological subtype, MUC1, and CDX2 for prognostication of resected ampullary adenocarcinoma. **Br J Cancer**, v. 113, n. 1, p. 64-8, Jun 30 2015. ISSN 0007-0920.
- 41 WANG, T. et al. Mucins differently expressed in various ampullary adenocarcinomas. **Diagn Pathol**, v. 6, p. 102, 2011. ISSN 1746-1596.

- 42 ZHOU, H. et al. Carcinoma of the ampulla of Vater: comparative histologic/immunohistochemical classification and follow-up. **Am J Surg Pathol**, v. 28, n. 7, p. 875-82, Jul 2004. ISSN 0147-5185 (Print)
0147-5185.
- 43 ANDERSSON, Y. et al. Phase I trial of EpCAM-targeting immunotoxin MOC31PE, alone and in combination with cyclosporin. **Br J Cancer**, v. 113, n. 11, p. 1548-55, Dec 1 2015. ISSN 0007-0920.
- 44 BELLONE, S. et al. Solitomab, an EpCAM/CD3 bispecific antibody construct (BiTE), is highly active against primary uterine serous papillary carcinoma cell lines in vitro. **Am J Obstet Gynecol**, v. 214, n. 1, p. 99.e1-8, Jan 2016. ISSN 0002-9378.
- 45 GEBAUER, F. et al. Serum EpCAM expression in pancreatic cancer. **Anticancer Res**, v. 34, n. 9, p. 4741-6, Sep 2014. ISSN 0250-7005.
- 46 LIAO, M. Y. et al. Generation of an anti-EpCAM antibody and epigenetic regulation of EpCAM in colorectal cancer. **Int J Oncol**, v. 46, n. 4, p. 1788-800, Apr 2015. ISSN 1019-6439.
- 47 ZHOU, F. Q. et al. Expression of EpCAM and Wnt/ beta-catenin in human colon cancer. **Genet Mol Res**, v. 14, n. 2, p. 4485-94, 2015. ISSN 1676-5680.
- 48 SABISTON, D. C.; TOWNSEND, C. M. **Sabiston textbook of surgery : the biological basis of modern surgical practice**. 18th. Philadelphia: Saunders/Elsevier, 2008. xxv, 2353 p. ISBN 9781416036753
- 49 O'CONNELL, J. B. et al. Survival after resection of ampullary carcinoma: a national population-based study. **Ann Surg Oncol**, v. 15, n. 7, p. 1820-7, Jul 2008. ISSN 1068-9265.
- 50 HUANG, W. et al. Meta-analysis of subtotal stomach-preserving pancreaticoduodenectomy vs pylorus preserving pancreaticoduodenectomy. **World J Gastroenterol**, v. 21, n. 20, p. 6361-73, May 28 2015. ISSN 1007-9327.
- 51 DIENER, M. K. et al. A systematic review and meta-analysis of pylorus-preserving versus classical pancreaticoduodenectomy for surgical treatment of periampullary and pancreatic carcinoma. **Ann Surg**, v. 245, n. 2, p. 187-200, Feb 2007. ISSN 0003-4932 (Print)
0003-4932.
- 52 _____. Pylorus-preserving pancreaticoduodenectomy (pp Whipple) versus pancreaticoduodenectomy (classic Whipple) for surgical treatment of periampullary and pancreatic carcinoma. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 11, p. Cd006053, 2014. ISSN 1361-6137.

- 53 KRISHNAN, S. et al. Role of adjuvant chemoradiation therapy in adenocarcinomas of the ampulla of Vater. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 70, n. 3, p. 735-43, Mar 1 2008. ISSN 0360-3016 (Print)
0360-3016.
- 54 NEOPTOLEMOS, J. P. et al. Effect of adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid or gemcitabine vs observation on survival in patients with resected periampullary adenocarcinoma: the ESPAC-3 periampullary cancer randomized trial. **Jama**, v. 308, n. 2, p. 147-56, Jul 11 2012. ISSN 0098-7484.
- 55 ZHOU, J. et al. Adjuvant chemoradiation versus surgery alone for adenocarcinoma of the ampulla of Vater. **Radiother Oncol**, v. 92, n. 2, p. 244-8, Aug 2009. ISSN 0167-8140.
- 56 KLINKENBIJL, J. H. et al. Adjuvant radiotherapy and 5-fluorouracil after curative resection of cancer of the pancreas and periampullary region: phase III trial of the EORTC gastrointestinal tract cancer cooperative group. **Ann Surg**, v. 230, n. 6, p. 776-82; discussion 782-4, Dec 1999. ISSN 0003-4932 (Print)
0003-4932.
- 57 MORINI, S. et al. Carcinoma of the ampulla of Vater: morphological and immunophenotypical classification predicts overall survival. **Pancreas**, v. 42, n. 1, p. 60-6, Jan 2013. ISSN 0885-3177.
- 58 ZHAO, X. Q. et al. Prognosis of ampullary cancer based on immunohistochemical type and expression of osteopontin. **Diagn Pathol**, v. 6, p. 98, 2011. ISSN 1746-1596.
- 59 HADDAD, L. B. D. P. **Expressão de marcadores imunoistoquímicos de origem tecidual e de carcinogênese nos adenocarcinomas tipo intestinal e pancreatobiliar da ampola de Vater**. 2009. 150 Departamento de Gastroenterologia, USP, São Paulo, SP.
- 60 CHU, P. G. et al. Immunohistochemical staining in the diagnosis of pancreatobiliary and ampulla of Vater adenocarcinoma: application of CDX2, CK17, MUC1, and MUC2. **Am J Surg Pathol**, v. 29, n. 3, p. 359-67, Mar 2005. ISSN 0147-5185 (Print)
0147-5185.
- 61 HANSEL, D. E. et al. Expression of the caudal-type homeodomain transcription factors CDX 1/2 and outcome in carcinomas of the ampulla of Vater. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 9, p. 1811-8, Mar 20 2005. ISSN 0732-183X (Print)
0732-183x.

8. ANEXOS

ANEXO A – CLASSIFICAÇÃO TNM (AJCC, 7ª EDIÇÃO, 2010)

Tumor primário (T)

Tx	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor confinado a ampola de Vater
T2	Tumor envolve a parede duodenal
T3	Tumor invade o pâncreas
T4	Tumor invade tecidos peripancreáticos ou outros órgãos

Linfonodos regionais (N)

Nx	Linfonodos não podem ser avaliados
N0	Sem linfonodos acometidos
N1	Linfonodos regionais acometidos

Metástases a distância (M)

Mx	Metástases não podem ser avaliadas
M0	Sem metástases a distância
M1	Presença de metástases a distância

Fonte: TNM (AJCCUICC), 7ª edição.

Estádio	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T1-3	N1	M0
III	T4	N qualquer	M0
IV	T qualquer	N qualquer	M1

Fonte: TNM (AJCCUICC), 7ª edição.

**ANEXO B - OFÍCIO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE
ÉTICA EM PESQUISA DA UFMG.**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 23377113.1.0000.5149

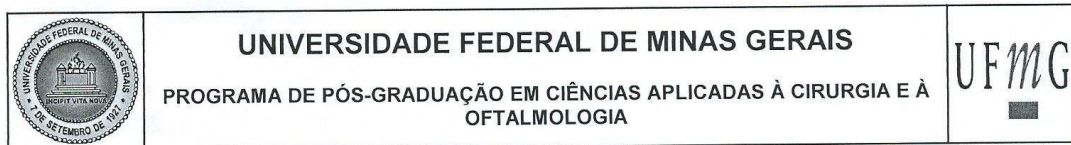
**Interessado(a): Profa. Vivian Resende
Departamento de Cirurgia
Faculdade de Medicina - UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 07 de janeiro de 2014, o projeto de pesquisa intitulado "**Expressão de EPCAM, MUC 1, MUC 2, MUC5AC e CDX2 em carcinomas periampulares**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


**Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG**

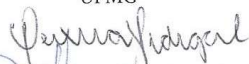
ANEXO C – FOLHA DE APROVAÇÃO**FOLHA DE APROVAÇÃO****ADENOCARCINOMA DA AMPOLA DE VATER: PERFIL IMUNO-HISTOQUÍMICO E FATORES PROGNÓSTICOS****JOÃO PAULO LEMOS DA SILVEIRA SANTOS**

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, área de concentração CICATRIZAÇÃO, linha de pesquisa Fatores Intervenientes na Cicatrização Tecidual.

Aprovada em 27 de junho de 2016, pela banca constituída pelos membros:



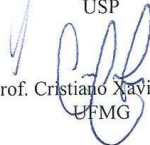
Profª Vivian Resende - Orientadora
UFMG



Profª. Paula Vieira Teixeira Vidigal
UFMG



Prof. Andre Luis Montagnini
USP



Prof. Cristiano Xavier Lima
UFMG

Belo Horizonte, 27 de junho de 2016.

ANEXO D – ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À
OFTALMOLOGIA

UFMG



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DO ALUNO **JOÃO PAULO LEMOS DA SILVEIRA SANTOS**

Realizou-se, no dia 27 de junho de 2016, às 08:00 horas, Faculdade de Medicina da UFMG, 3 andar, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *ADENOCARCINOMA DA AMPOLA DE VATER: PERFIL IMUNO-HISTOQUÍMICO E FATORES PROGNÓSTICOS*, apresentada por JOÃO PAULO LEMOS DA SILVEIRA SANTOS, número de registro 2014659600, graduado no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Vivian Resende - Orientador (UFMG), Prof(a). Paula Vieira Teixeira Vidigal (UFMG), Prof(a). Andre Luis Montagnini (USP/HC), Prof(a). Cristiano Xavier Lima (UFMG).

A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
 Belo Horizonte, 27 de junho de 2016.

Prof(a). Vivian Resende (Doutora)

Prof(a). Paula Vieira Teixeira Vidigal (Doutor)

Prof(a). Andre Luis Montagnini (Doutor)

Prof(a). Cristiano Xavier Lima (Doutor)